Skript zum Demonstrationspraktikum

Cytologische und Histologische Grundlagen der Biologie

von

Prof. Dr. Rolf Marschalek

am

Institut für Pharmazeutische Biologie
Fachbereich 15
Biozentrum der Universität Frankfurt/Main

Teile dieses Scripts sind aus folgenden Lehrbüchern entlehnt und modifiziert worden:

MOLEKULARBIOLOGIE DER ZELLE
3. Auflage
B Alberts, D Bray, J Lewis, M Raff, K Roberts & JD Watson
ISBN 3-527-30055-4

Bilder stammen von/aus dem:

der CD "The ART of MBoC3"

und

COLOR TEXTBOOK OF HISTOLOGY
3. Auflage
LP Gartner & JL Hiatt
ISBN 0-7216-5124-0

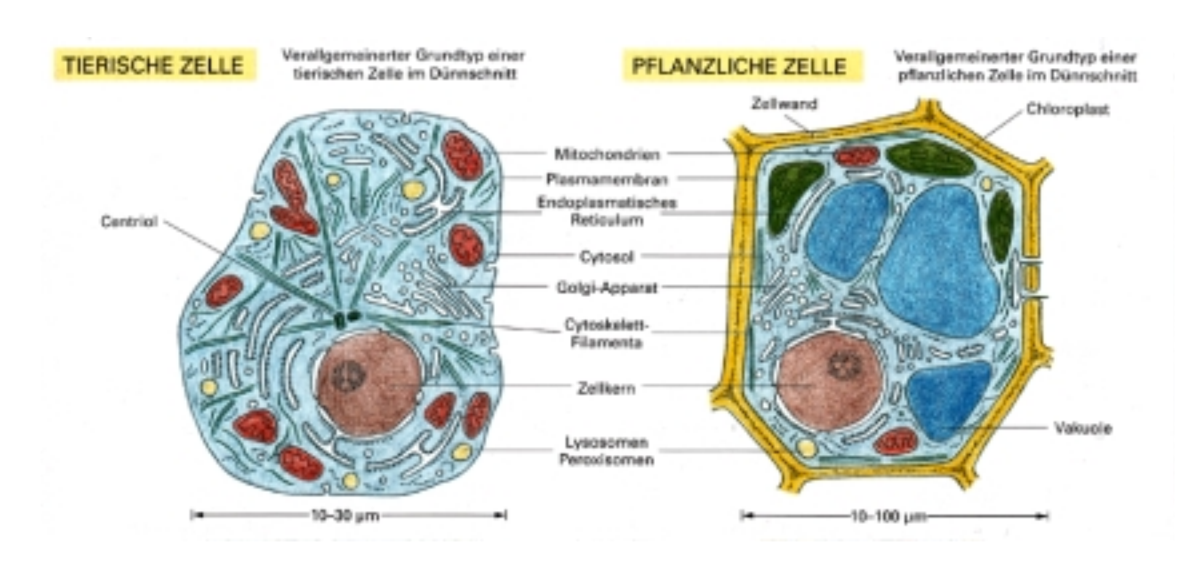
Oktober 2000

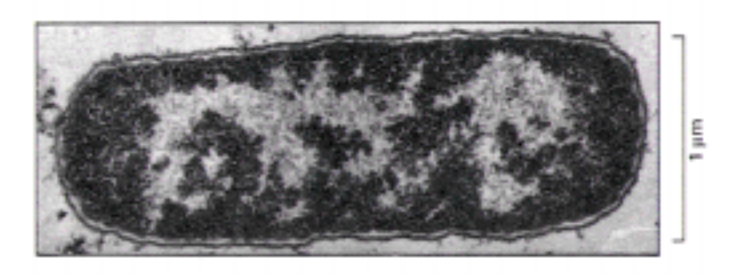
Inhaltsangabe

Die Zelle, ihre Grundbausteine und Prozesse

- *die Zelle als Grundbaustein*

Alle Organismen sind aus Zellen aufgebaut, und sei es nur aus einer Einzigen (wie z.B. Bakterien, Protozoen und manche Algen). Für Zellen lassen sich gemeinsame Charakteristika feststellen:





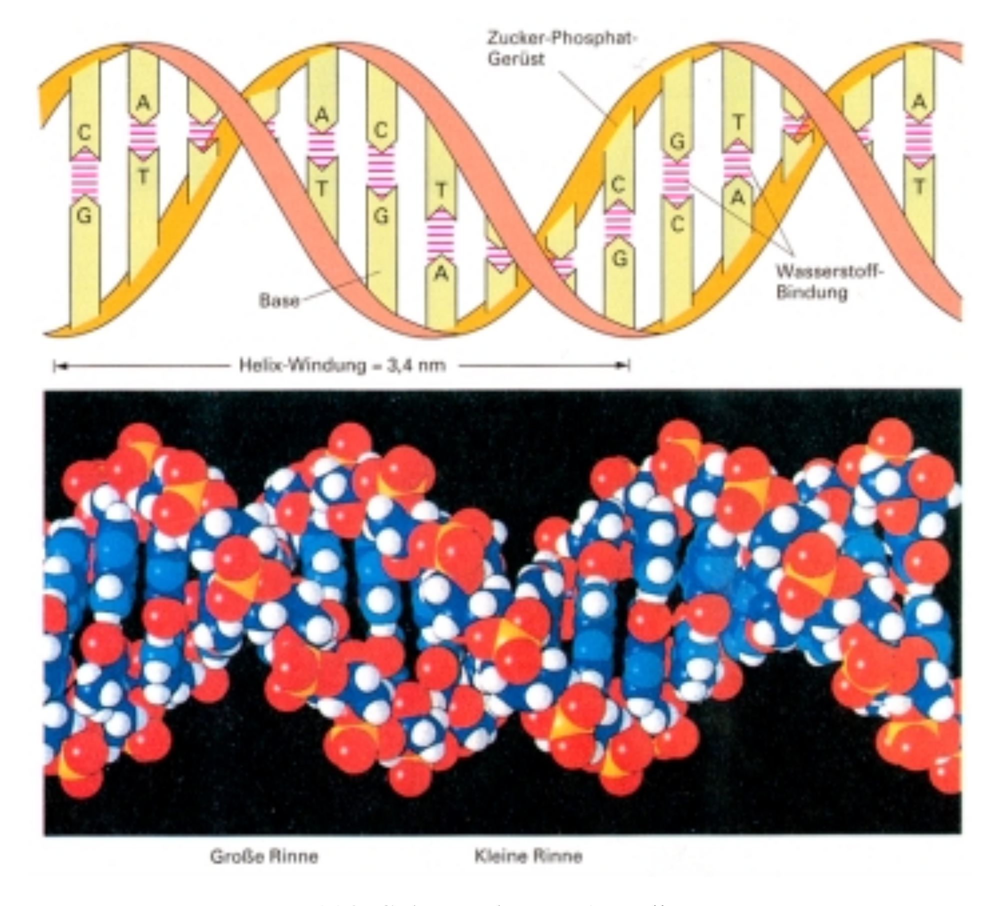
001: *Escherichia coli* Zelle

ZELLEN ENTSTEHEN IMMER AUS ZELLEN

klingt trivial; ein menschliches Individuum ist aus ca. 10^{14} Zellen aufgebaut; allein 10^{10} Zellen sind für unser Gehirns notwendig; täglich werden ca. 10^{7} B-Zellen und 10^{11} Granulozyten hergestellt, um den vielfältigen Aufgaben unseres Immunsystems gerecht zu werden; täglich werden ca. 1% (10^{12} Zellen) unserer Zellen ersetzt.

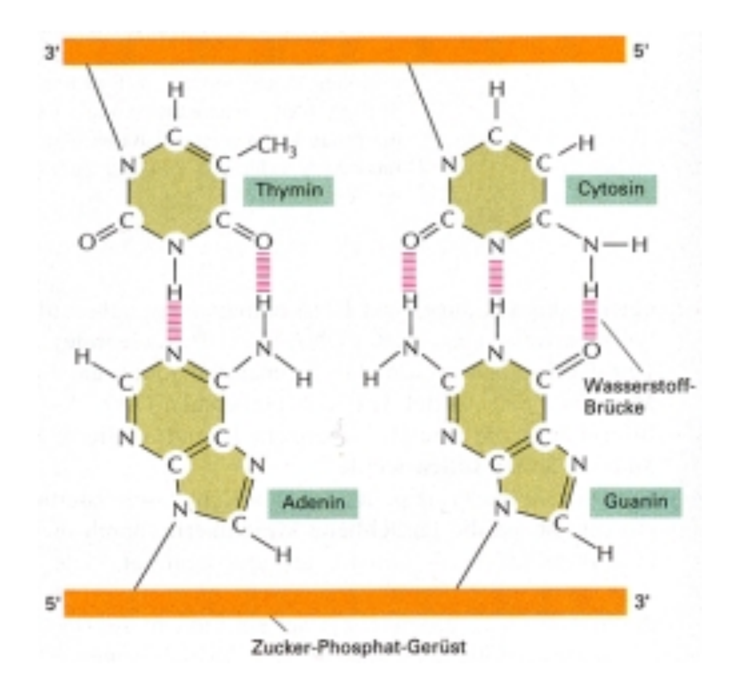
JEDE ZELLE HAT EINEN KOMPLETTEN SATZ AN ERBANLAGEN (GENOM), DER ALS INFORMATIONSSPEICHER FÜR BAU UND FUNKTION EINER ZELLE DIENT

Jede Zelle enthält ihren eigenen Bauplan, der in Form von Genen organisiert ist. Die Summe aller Gene und ihrer Kontrollsequenzen wird als Genom bezeichnet. Genome sind in Form von polymeren Kettenmolekülen aufgebaut, die man als DNA bezeichnet. Genomgrößen können zwischen den Größenordnungen 5 x 10^3 (Retroviren) und 10^{11} bp (Farne, Lilie) variieren. Das menschliche Genom hat ca. 3 x 10^9 bp.



002: Schema der DNA-Helix

Das Rückgrat dieses polymeren Kettenmoleküls wird aus Ribose-Einheiten aufgebaut, die über eine 3´->5´-Phosphodiesterbrückenbindung verknüpft sind. Damit hat jeder DNA-Strang eine vorgegebene chemische Orientierung. Die Phosphatgruppen bewirken den Säurecharakter der DNA. Am C_1-Atom der Ribose-Einheiten findet man in der DNA die vier Basen **Adenin**, **Guanin**, **Cytosin** und **Thymidin**:

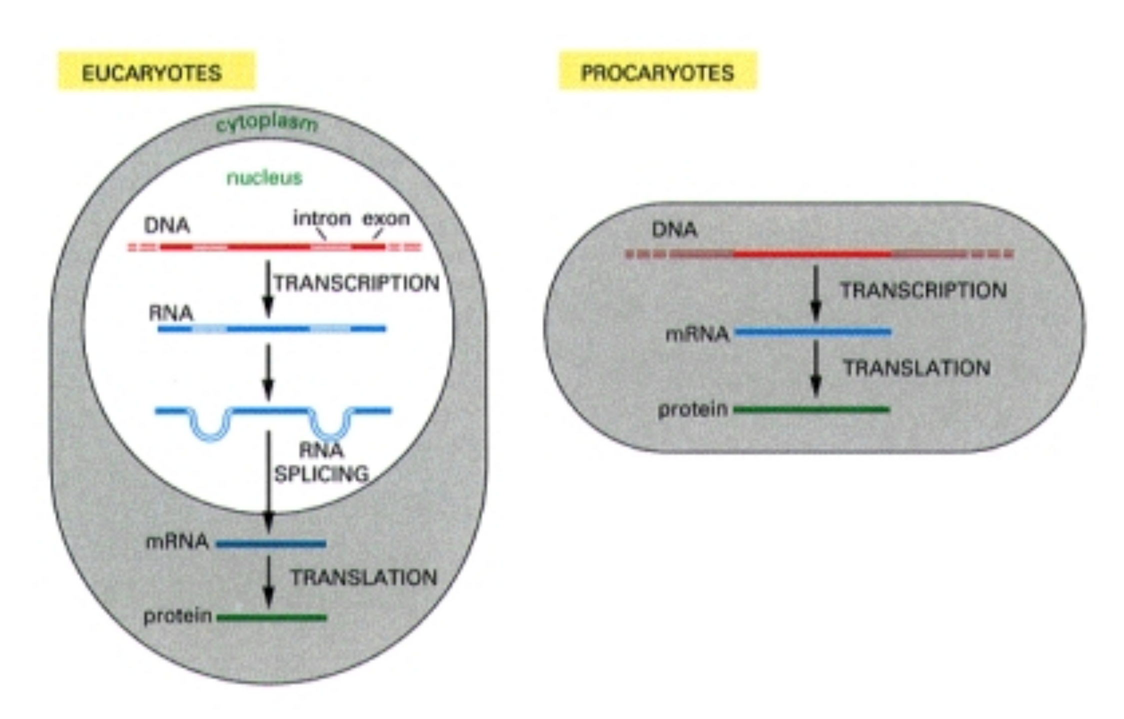


003: Die vier Basen der DNA und ihre Wasserstoffbrückenbindungen

Diese vier Basen sind hinreichend und notwendig, um die genetische Information zu speichern. Jeweils zwei DNA-Stänge sind **antiparallel** zueinander angeordnet und formen dabei die typische, rechtsdrehende **DNA-Doppelhelix** mit ihren spezifischen Charakteristika (Basenabstand 3 nm, 10.5 bp pro helikalem Turn, Höhe des Turns 30 nm, planare Anordnung der Basen). Aufgrund der Basenzusammensetzung wußte man bereits sehr früh (1950-60), daß alle Basenpaarungen zwischen den beiden antiparallelen Helices durch Purin-Pyrimidin Basenpaarungen entstehen: Adenin paart mit Thymidin und Guanin paart mit Cytosin (**Chargaff'sche Regel**). Der GC-Gehalt der Genome ist weniger an der Komplexität der Organismen, sondern an ihre Umwelt gekoppelt (GC-Gehalt Varianz zwischen 20 und 80%). In der Regel findet man jedoch einen GC-Gehalt von ca. 40% in den kodierenden Abschnitten des Genoms. (Zum Zwecke der Transkription muß der DNA-Doppelstrang aufgeschmolzen werden. Ein GC-Gehalt von ca. 40% scheint für RNA Polymerasen energetisch optimal zu sein.)

Der genetische Informationsfluß läuft von DNA über RNA zu Protein

Dieses Dogma ist nicht mehr allgemein gültig, besagt jedoch in seinen Grundzügen, daß die genetische Information in unidirektionaler Richtung ausgedrückt wird: DNA wird in RNA **transkribiert** und anschließend in Protein **translatiert**.

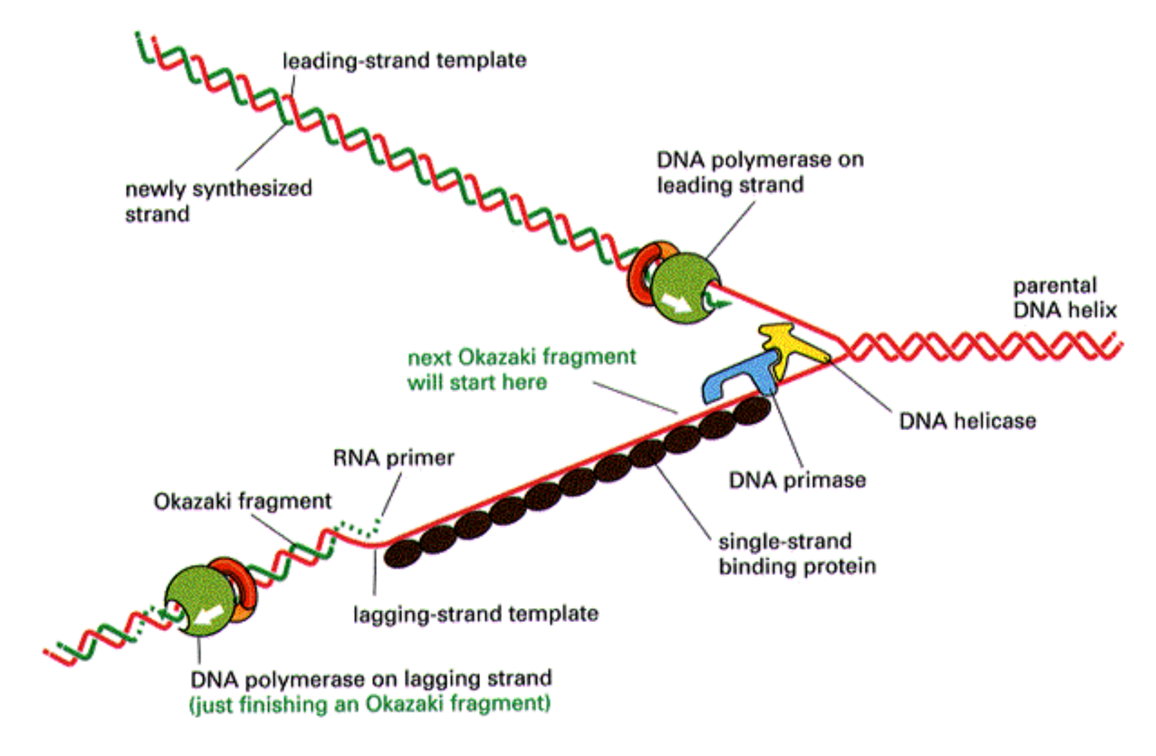


004: Dogma des genetischen Informationsflusses

Diese Dogma wurde zunächt durch **Retroposons** (Retrotransposons und Retroviren) widerlegt, die ein RNA-Intermediat als genetische Transportform verwenden. Das RNA-Intermediat dieser Retroposons wird zunächst **in DNA umgeschrieben** und dann **ins Wirtsgenom integriert**. Erst danach wird getreu dem Dogma die genetische Information in Protein übersetzt. Eine weitere Ausnahme ist der ***RNA-Editing*-Prozeß**. Trypanosomen benutzen diesen Prozess, um das Immunsystem ihrer Wirte zu umgehen, denn sie mutieren über *RNA-Editing* ihre antigenen Oberflächenproteine, so daß das Immunsystem des Wirtes nicht mehr in der Lage ist, diesen evasiven Mechanismus zu kontrollieren. RNA-Editing besagt, daß bestimmte Gene nur in **kryptischer Form** vorhanden sind, ungefähr so, wie wenn man alle Vokale aus Texten streichen würde. Die fehlenden Buchstaben werden auf RNA-Ebene durch andere RNA-Moleküle nachträglich integriert.

DAS GENOM IST ZUR IDENTISCHEN REPLIKATION BEFÄHIGT

Eine Zellteilung setzt voraus, daß auch das Genom dupliziert werden kann. Bei der **Replikation** der DNA wird die DNA-Doppelhelix in zwei Einzelstränge getrennt und durch DNA Polymerasen kopiert (repliziert). Der Prozess der Replikation geht nicht völlig fehlerfrei vonstatten. Man geht davon aus, daß eine Fehlerrate von ca. 10^{-9} bis 10^{-10} vorliegt.

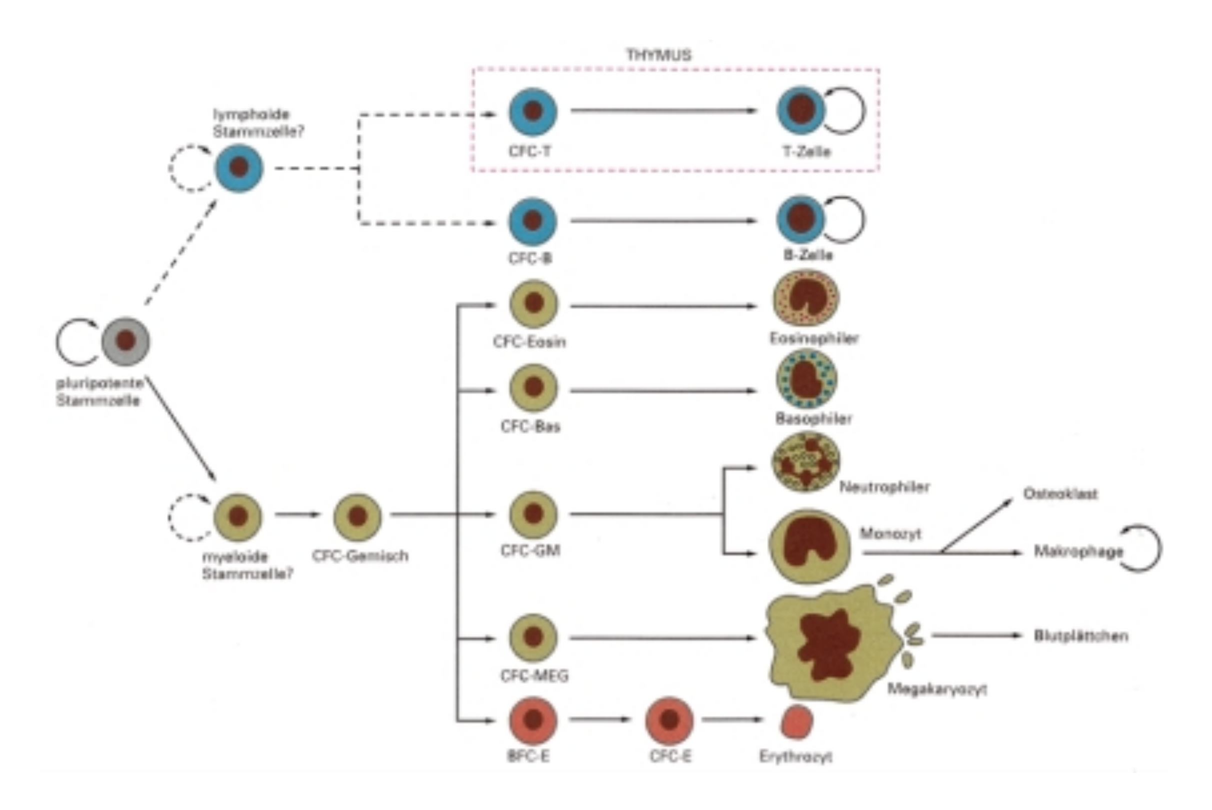


005: Replikationsprozess

Ohne diese **Fehlerrate** gäbe es keine **Evolution**. Mutationen, die zur Evolution beitragen sollen, müssen jedoch in den **Keimzellen** vorliegen, da sie sonst nicht weiter vererbt werden können. Auf der anderen Seite können Mutationen in den **somatischen Zellen** zu Entartungen auf zellulärer Ebene führen. Normalerweise reagiert ein Organismus auf diese Situation mit **Apoptose** (programmierter Zelltod). In ungünstigen Situationen können solche somatischen Mutationen aber auch unkontrolliertes Zellwachstum (**Krebs**) zur Folge haben.

ZELLEN SIND DIFFERENZIERUNGSFÄHIG

Zellen haben generell die Fähigkeit, sich in gleichartige Zellen zu teilen. Diese Fähigkeit nennt man die **Toti-** oder **Omnipotenz** von Zellen. Dieses Phänomen ist begleitet von einer genetischen Omnipotenz. Sobald man jedoch multizelluläre Organismen betrachtet, so scheint diese Fähigkeit verloren zu gehen. Betrachtet man zum Beispiel die Entwicklung, die eine befruchtete Eizelle durchläuft, um einen komplexen Organismus zu generieren, so stellt man fest, daß viele Entwicklungsprozesse durchlaufen werden, die man unter dem Oberbegriff "**Differenzierung**" zusammenfaßt. Die einzelnen Prozesse der Differenzierung sind sehr komplex und ich werde im Laufe dieser Vorlesung noch einige dieser Prozesse genauer beschreiben.



006: Differenzierungsprozesse am Beispiel der Hämatopoese

Alle Differenzierungsprozesse, die uns heute bekannt sind, werden durch genetische Schaltvorgänge bestimmt, die entweder autonom oder durch extrazelluläre Signale hervorgerufen werden. Die letztgenannten Prozesse garantieren die Koordination von verschiedenen Differenzierungsprozessen, um letztendlich einen komplexen Organismus entstehen zu lassen. Autonome Differenzierungsprozesse lassen sich

nur in der sehr frühen Ontogenese nachweisen. Demzufolge sind alle späteren Entwicklungsprozesse das Resultat von direkten oder indirekten “kommunikativen Prozessen”.

Fast alle diese Differenzierungsprozesse führen zu einer **Spezialisierung** der betroffenen Zellen, und damit aber gleichzeitig auch zu einem **Verlust ihrer “Omnipotenz”**. Das bedeutet, daß multizelluläre Organismen i.d.R. die Omnipotenz der somatischen Zellen so dramatisch reduzieren können, daß sie nur noch bestimmte Aufgaben übernehmen können. Bestes Beispiel dafür sind die roten Blutkörperchen, die nicht einmal mehr einen Zellkern besitzen. Sie überleben ca. 120 Tage als ausdifferenzierte Erythrozyten im Blutstrom und betreiben neben der Glykolyse lediglich noch Gas-Transport. Ähnliche Szenarien gelten auch für andere “ausdifferenzierte” Körperzellen: sie erfüllen als Nerven-, Muskel- oder Leberzellen spezifische Funktionen, die nur im Gesamtkontext eines multizellulären Organismus einen Sinn ergeben.

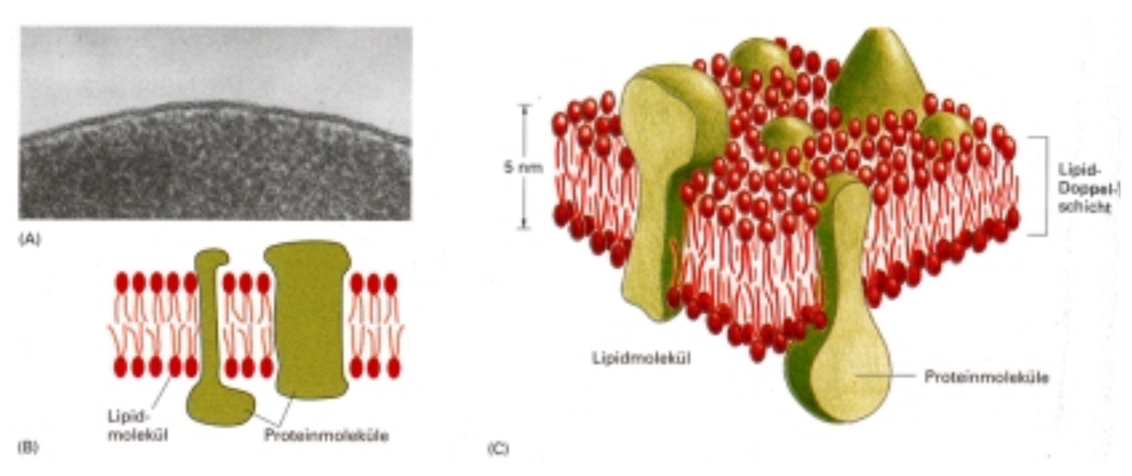
Für regenerative Prozesse existieren jedoch in allen multizellulären Organismen sogenannte **Stammzellen**. Diese Stammzellen existieren wahrscheinlich in allen Organen von multizellulären Organismen. Sie sind durch **zwei Kennzeichen** geprägt: (1) sie besitzen **Omnipotenz** und (2) haben sie die Fähigkeit zur **Selbsterneuerung ohne Verlust der Omnipotenz**. Die Anzahl dieser Stammzellen schwankt zwischen verschiedenen Organen und ist auch zwischen verschiedenen Arten unterschiedlich. In der Regel liegt die Anzahl dieser Stammzellen jedoch zwischen 10^{-4} und 10^{-7}.

Bei Pflanzen gibt es ein ähnliches System. Dort sind es **Meristem-Gewebe**, die zunächst durch **Proliferation** einen Zellpool erzeugen, der dann anschließend durch **Differenzierungsprozesse** zur Ausbildung des apikalen Wachstums (Längenwachstum), des Bastgewebes (Phloem) zwischen Xylem und Rinde (Dickenwachstum), der Blütenbildung (Fortpflanzungsorgane) und des Wurzelwachstums führt.

ZELLEN SIND DURCH MEMBRANEN ABGEGRENZT

Jede Zelle ist von einer Membran umhüllt. Sie besteht aus einer Doppelschicht aus Phospholipiden mit ein- oder angelagerten Proteinen. Diese Membran ist ca. **6 nm** dick und erscheint nach Schwermetallbehandlung (i.d.R. Osmium) als einheitliche Struktur (dunkel-hell-dunkel) im Mikroskop. Diese Membranen werden als **Zell-** oder **Plasmamembranen** bezeichnet.

Zellmembranen trennen das Zellinnere vom umgebenden - i.d.R. wässrigen - Milieu. Augrund ihres chemischen Charakters bilden Zellmembranen zudem eine **Barriere** für den Ein- und Austritt von kleinen (**Ionen**) oder großen Substanzen (**Makromoleküle**) und sorgen damit für die Aufrechterhaltung des “inneren Milieus” einer Zelle.



007: Aufbau der Zellmembran

Eingelagerte Proteine dienen zum passiven oder aktiven Transport von Ionen oder Makromolekülen, für sekretorische Prozesse, für die Aufnahme von Flüssigkeit (**Pinozytose**) und Feststoffen (**Phagozytose**) und zur Rezeptor-vermittelten Perzeption von extrazellulären Signalen.

Bei höheren Eukaryonten findet man innerhalb der Zelle ebenfalls Membran-umhüllte Strukturen, die **intrazelluläre Kompartimente** ausbilden. Damit können auch innerhalb der Zelle spezialisierte Funktionen durchgeführt werden. Beispiele dafür sind der **Zellkern**, der **Golgi-Apparat**, das **endoplasmatische Reticulum**, **Mitochondrien**, **Chloroplasten**, **Lysosomen** und **Speichergranulae**.

ZELLEN SIND KOMPLEX ORGANISIERT

Das Genom einer Zelle enthält den vollständigen Bauplan für diese Zelle oder für einen komplexen, multizellulären Organismus. Die Umgebung einer Zelle enthält in der Regel ein Milieu, daß sich aus Ionen und Makromolekülen zusammensetzt, die jedoch nicht in organisierter Form vorliegen. Damit ist die Zelle im physikalischen Sinn ein Ort, an dem die Gesetze der **Entropie aufgehoben** werden. Deshalb ist erforderlich, daß Zellen durch ständige Energieproduktion diesen geordneten Zustand aufrechterhalten. Verlieren sie diese Fähigkeit, so stirbt diese Zelle und fügt sich nach Zellyse in das umgebenden Milieu ein.

ZELLEN SIND OFFENE SYSTEME IM FLIEẞGLEICH-GEWICHT

Zellen sind offene Systeme, weil sie ständig Energie und Materie sowohl aufnehmen als auch abgeben können. Insofern stehen Zellen mit ihrer Umgebung nicht in einem starren, sondern in einem Fließgleichgewicht. Für jedes Ion oder Makromolekül, daß für das (Über)Leben einer Zelle von Bedeutung ist, gibt es Soll- und Stellwerte.

Unter einem globalen Aspekt befinden sich pflanzliche und tierische Zellen in einem übergeordneten Gleichgewicht: **pflanzliche Zellen** mit Chloroplasten können mit Hilfe eines photolytischen Prozesses die Primärenergie des eintreffenden Sonnenlichts dazu benutzen, um mit Hilfe von Wasser den Sauerstoff unserer Atmosphäre zu produzieren:

$$\mathbf{4\ H_2O \text{ -> } 4\ H^+ + 4e^- + O_2}$$

Die dabei freiwerdenden Protonen und Elektronen werden dazu verwendet, um Kohlendioxid (CO_2) zu binden und in Form von Traubenzucker zu speichern und weiteren Sauerstoff zu produzieren:

$$\mathbf{6\ H_2O + 6\ CO_2 \text{ -> } C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2}$$

Tierische Zellen und Pflanzenzellen ohne Zufuhr dieser Lichtenergie können in biochemischen Prozessen aus Sauerstoff und Traubenzucker wieder CO_2 und Wasser produzieren. Deshalb befindet sich die gesamte Biosphäre unserer Erde in einem Gleichgewicht.

DIE ENERGIESPEICHERUNG ERFOLGT IN FORM VON ATP, FÜR MANCHE PROZESSE IN FORM VON GTP

Zellen benutzen eine Währungseinheit, um ihren energetischen Stoffwechsel aufrechtzuerhalten. Durch "**katabole Biochemismen**" werden Makromoleküle abgebaut und dabei die freiwerdende Bindungsenergie in Form von ATP gespeichert. Umgekehrt können durch "**anabole Biochemismen**" neuartige Makromoleküle hergestellt, bzw. können bestimmte Strukturen innnerhalb der Zelle aufrechterhalten werden. Die Energieproduktion wird durch zwei Primärmechanismen gewährleistet: die **Glykolyse** und die **Atmungskette (oxydative Phosphorylierung)**. Energie wird primär in ATP gespeichert, wobei bei der Umsetzung von:

ATP in ADP und Pi

insgesamt **44 KJ/Mol** Energie freigesetzt wird. Ähnliches gilt auch für GTP. GTP wird beim Sehprozess und beim Prozess der Translation, d.h. bei der Herstellung von Proteinen innerhalb der Zelle benötigt.
Neben den anabolen Biochemismen braucht die Zelle ATP, um eine Vielzahl von Prozessen zu steuern und zu unterhalten. Beispiel dafür sind:

- <u>Phosphorylierung von Proteinen:</u>
  - Konformationsveränderung im Nanometerbereich
  - katalytische Aktivierung oder/und spezifische Aktivierung
  - bewirkt Kontraktionen zwischen Actin und Myosin
  - Aktivierung von Ionenpumpen und Weiterleitung von Reizsignalen
- <u>Beladung von Proteinen:</u>
  - katalytische Aktivierung oder spezifische Aktivierung

Prinzipiell können sowohl pflanzliche als auch tierische Zellen aus Glucose ihre Energie beziehen. Die Energie-Produzenten innerhalb der Zelle sind die Mitochondrien, semi-autonome Organellen, die in jeder lebenden Zelle vorhanden sind. Aus einem Molekül Glucose entstehen durch den cytoplasmatischen Prozess der **Glykolyse**, der anschließenden Umwandlung von **Acetyl-CoA** im **Citratzyklus** in entsprechende **Reduktions-Äquivalente** ($NADH_2^+$), und der Veratmung (O_2)

dieser $NADH_2^+$-Moleküle durch **oxidative Phosphorylierung** in der Mitochondrienmembran etwa **38 ATP** Moleküle und **Wasser** (H_2O). Beim Umsatz von **180 g** Traubenzucker (1 Mol) entspricht dies einer Energiemenge von **1,672 MJ** (38 Mol ATP = 2.29×10^{25} Moleküle).

Die Konsequenzen dieser Energieproduktion sind: **Stoffwechsel**, **Wachstum**, **Reaktionsfähigkeit** (Reizbarkeit) und **Bewegungsfähigkeit** der Zellen. Mit Hilfe der universellen Energie-Einheiten (ATP) ist jede Zelle in der Lage, verschiedenste Arbeiten zu leisten. Anabole Stoffwechselwege, wie z.B. die Synthese notwendiger Aminosäuren, Eiweiße, Lipide oder Vitamine, benötigen sehr viel Energie. Betrachtet man z.B. den simplen Vorgang einer **Zellteilung**, so müssen alle wichtigen Strukturproteine einer Zelle verdoppelt werden. Allein die Verdopplung der genomischen DNA einer menschlichen Zelle benötigt mindestens 1.2×10^{10} ATP Moleküle, nur um alle Phosphodiesterbindungen im Zucker-Phosphat-Rückgrad der DNA auszubilden!

Gleiches gilt natürlich auch für alle **kontraktilen Bewegungen** innerhalb von Zellen. Solche Bewegungen schließen z.B. Zellbewegungen, Umbau des strukturgebenden Actin/Myosin-Gerüstes und Transportvorgänge von der Zellmembran ins Zellinnere mit ein. Am Beispiel der **Muskelzelle** sei nur erwähnt, daß wir hier ganz besondere Strukturen vorliegen haben, die ATP-getriebene Mikrobewegungen zwischen Actinfilamenten und Myosinfilamenten ermöglichen (siehe Seite 199ff). Die Summe dieser Mikrobewegungen führt dazu, daß höhere Lebewesen mit ihren Muskeln Arbeit verrichten können.

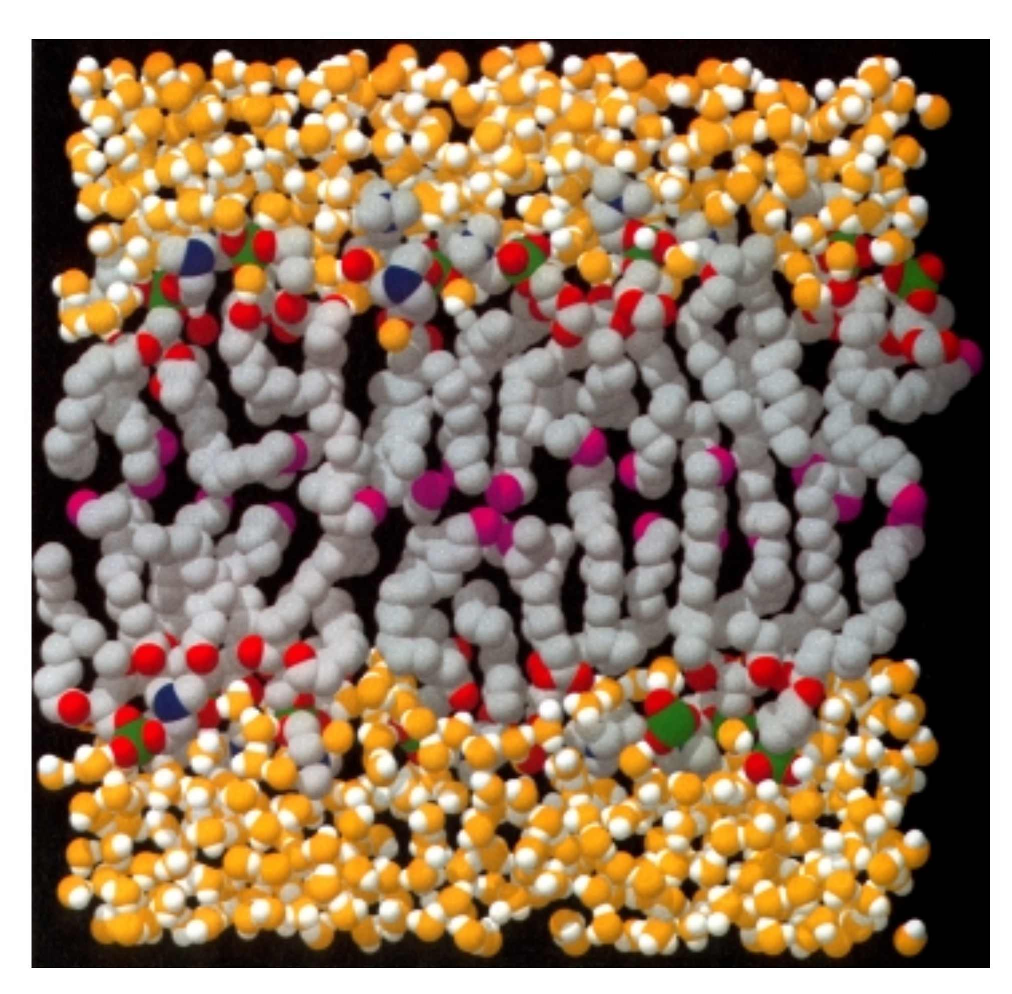
Ein anderes Paradebeispiel sind **Nervenzellen**. Der Reiz-Perzeption und -Weiterleitung in Nervenzellen liegen elektrische Prozesse in Form von Ionenströmen zugrunde. Im gereizten Zustand strömen Ionen selektiv in Nervenzellen ein (z.B. Na^+) oder aus ihr heraus (z.B. K^+). Um dies zu erreichen, müssen Zellen im Ruhezustand K^+ und Na^+-Ionen entgegen eines Konzentrationsgefälles in die Zelle hinein- oder aus der Zelle herauspumpen. Diese Na^+/K^+-Pumpe ist ein integrales Protein der Zellmembran und benötigt ATP für seine Arbeit.

Um Struktur-Funktionsbeziehungen von Zellen besser zu verstehen, wollen wir die Substrukturen von eukaryonten Zellen studieren.

- *Aufbau und Funktion…*

DER ZELLMEMBRAN

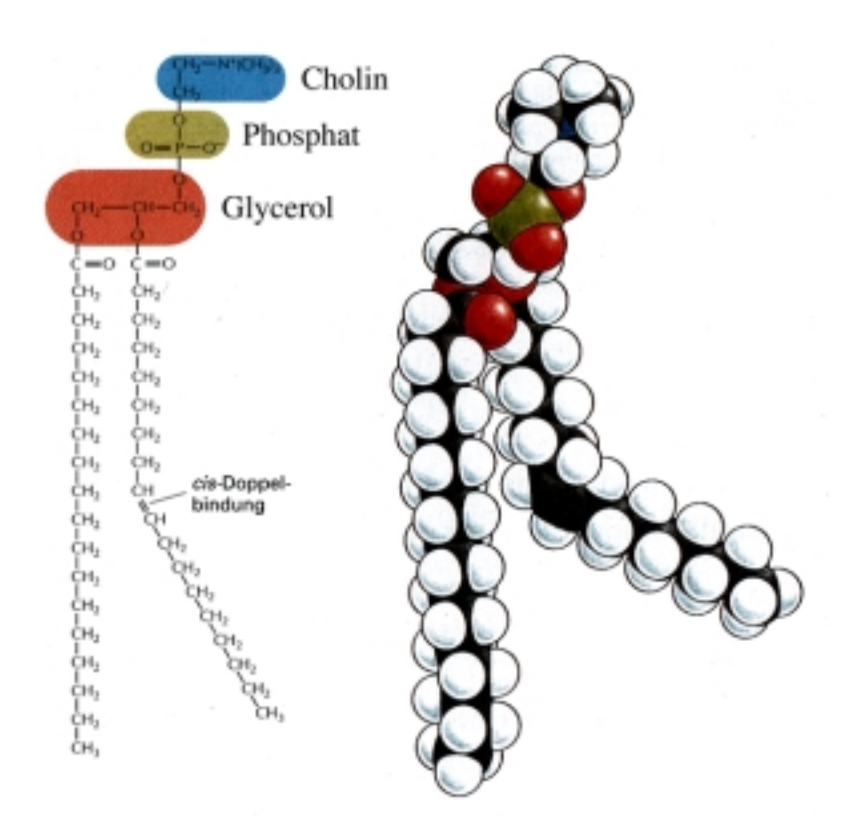
Trotz ihrer unterschiedlicher Funktionen haben alle biologischen Membranen eine gemeinsame Grundstruktur: jede Membran stellt eine sehr dünne Schicht von Lipid- und Proteinmolekülen dar, die vor allem durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Zellmembranen sind dynamische, flüssige Strukturen und die meisten ihrer Bestandteile sind in der Lage, sich innerhalb der Membranebene zu bewegen. Die Lipidmoleküle sind in einer durchgehenden Doppelschicht von etwa **5 -6 nm Stärke** angeordnet.



008: Schematische Darstellung einer “Doppelmembran”

Diese Lipid-Doppelschicht stellt die Membran-Grundstruktur dar und dient als mehr oder weniger **undurchdringliche Barriere** für die meisten wasserlöslichen Moleküle. Die meisten anderen Membranfunktionen - z.B. der Transport spezifischer Moleküle durch die Membran hindurch, oder die Katalyse Membran-assoziierter Reaktionen, wie der ATP-Synthese - werden von Proteinmolekülen vermittelt, die in dieser Lipid-Doppelschicht „gelöst" sind. Einige Proteine innerhalb der Plasmamembran dienen als Verbindungselemente, die die Membran mit dem **Cytoskelett** sowie mit der **Extrazellulärmatrix** und/oder mit einer benachbarten Zelle verbinden, während andere als **Rezeptoren** für den Empfang und die Übermittlung chemischer Signale aus der Umgebung der Zelle verantwortlich sind. Wie zu erwarten, sind Zellmembranen **asymmetrische Strukturen**: die Lipid- und Protein-Zusammensetzungen der Außen- und Innenfläche unterscheiden sich entsprechend den zu erfüllenden Funktionen.

Lipidmoleküle sind wasserunlöslich, lösen sich jedoch bereitwillig in organischen Lösungsmitteln. Bei den meisten tierischen Zellmembranen machen sie etwa 50% der Membranmasse aus; alles übrige ist nahezu ausschließlich Protein. In einem Abschnitt der Lipid-Doppelschicht von etwa 1 μm^2 befinden sich ungefähr 5 x 10^6 Lipidmoleküle; das entspricht ca. 10^9 Lipidmolekülen in der Plasmamembran einer kleinen tierischen Zelle. Alle Lipidmoleküle in Zellmembranen sind amphipathisch. Das bedeutet sie besitzen ein hydrophiles und ein hydrophobes Ende. Am weitesten verbreitet sind dabei die **Phospholipide**. Sie bestehen aus einer polaren „Kopf"-Gruppe und zwei hydrophoben Kohlenwasserstoff-„Schwänzen". Die „Schwänze" sind in der Regel Fettsäuren und können von unterschiedlicher Länge sein (meist enthalten sie zwischen 14 und 24 Kohlenstoffatomen). Einer der „Schwänze" enthält normalerweise eine oder mehrere cis-Doppelbindungen (ungesättigte Fettsäure), der andere hingegen nicht (gesättigte Fettsäure). Die Unterschiede in Länge und Sättigungsgrad der Fettsäuren sind von besonderer Bedeutung, weil sie die Fähigkeit der Phospholipid-Moleküle beeinflussen, sich dicht aneinanderzulagern: sie verändern dadurch die **Fluidität** der Membran.

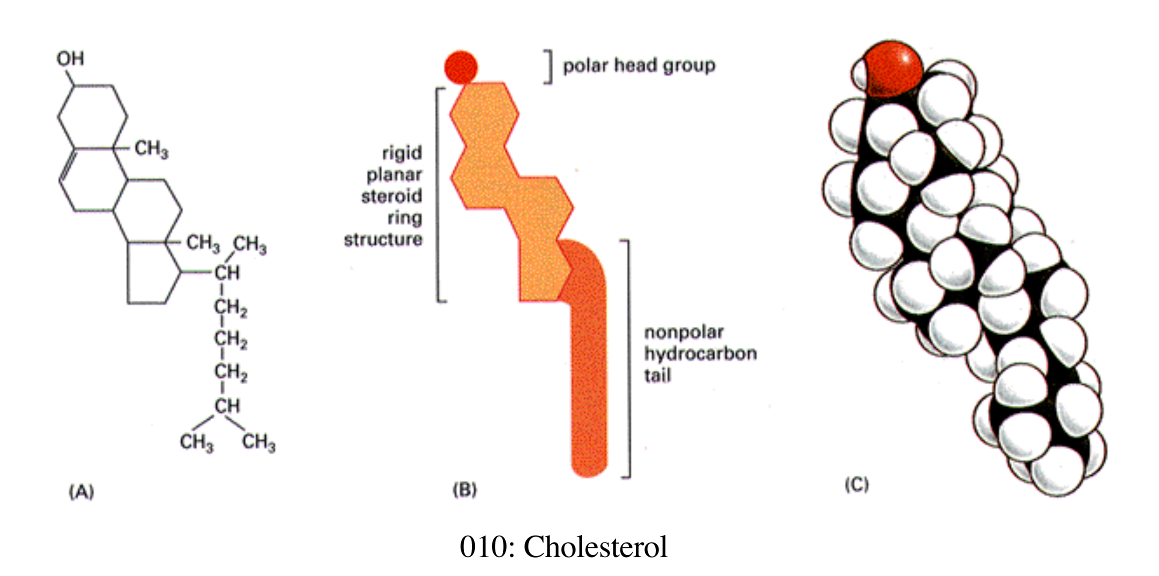


009: Phosphatidylcholin, ein typisches Phospholipid

Der genaue Grad der **Membranfluidität** hat biologische Bedeutung. Man kann zum Beispiel zeigen, daß gewisse Transportvorgänge und Enzymaktivitäten an der Membran zum Erliegen kommen, wenn man die Membranviskosität experimentell über einen bestimmten Grenzwert hinaus erhöht. Die Fluidität einer Lipid-Doppelschicht hängt sowohl von ihrer Zusammensetzung als auch von der Temperatur ab. Eine künstliche Lipid-Doppelschicht, die aus einem einzigen Phospholipid-Typ besteht, geht an einem charakteristischen Erstarrungspunkt aus ihrem flüssigen Zustand in einen gelartigen Zustand über (**Phasenübergang**). Die Temperatur, bei der ein solcher Phasenübergang stattfindet, liegt niedriger, wenn die Kohlenwasserstoffketten kurz sind, oder wenn sie Doppelbindungen haben.

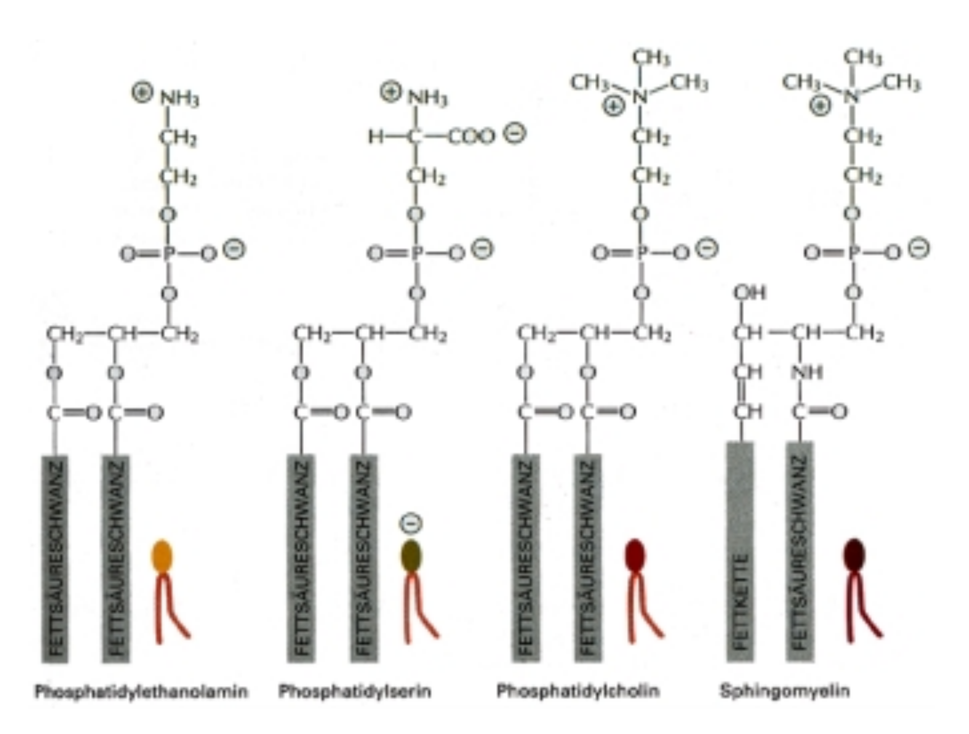
Bakterien, Hefen und andere Organismen, deren Körpertemperatur von der Temperatur ihrer Umgebung abhängig ist, regulieren die Fettsäure-Zusammensetzung ihrer Membranlipide ständig, um eine relativ konstante Membranfluidität zu erhalten. Auf diese Weise wird die Fluidität der Doppelschicht konstant gehalten.

Die Lipid-Doppelschicht vieler Zellen besteht jedoch nicht nur aus Phospholipiden, sondern enthält häufig darüber hinaus auch **Cholesterol** und **Glykolipide**. Eukaryontische Plasmamembranen haben einen besonders hohen Cholesterol Gehalt - oft bis zu einem Verhältnis von einem Molekül Cholesterol auf ein Phospholipid-Molekül. **Cholesterol** erhöht die Fähigkeit der Lipid-Doppelschicht, als eine Permeabilitätsbarriere zu wirken. Die Moleküle richten sich innerhalb der Doppelschicht so aus, daß sich ihre Hydroxylgruppen in der Nähe der polaren Kopfgruppen der Phospholipide befinden. Ihre starren, flachen Steroidringe treten mit den Bereichen der Kohlenwasserstoffketten in Wechselwirkung, die den polaren Kopfgruppen am nächsten liegen und setzen deren Beweglichkeit dadurch herab.



010: Cholesterol

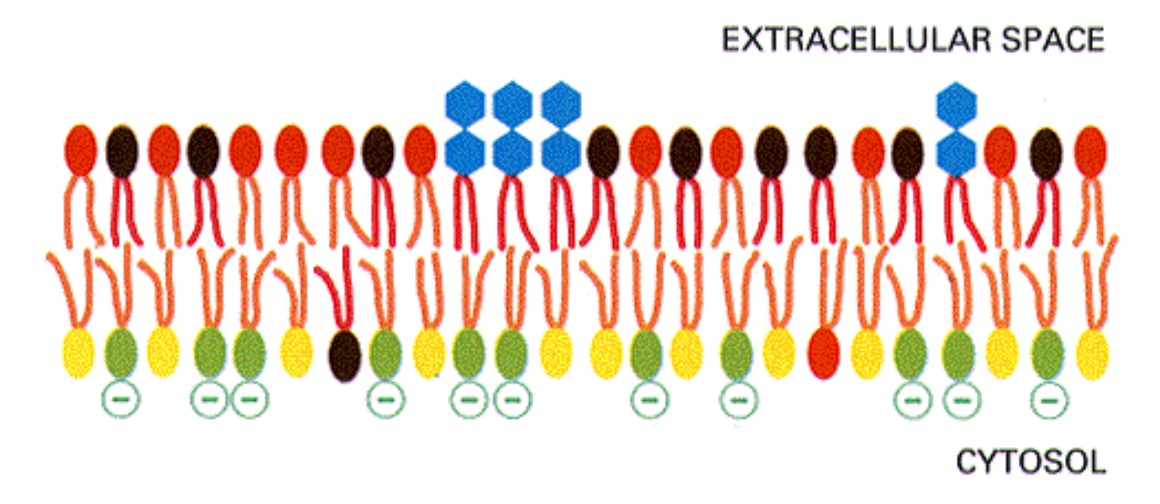
Plasmamembranen von **Bakterien** bestehen hauptsächlich aus Phospholipiden eines Typs und enthalten **kein Cholesterol**; die mechanische Stabilität dieser Membranen wird durch die sie umgebende Zellwand gewährleistet. Die Plasmamembranen **eukaryontischer Zellen** dagegen enthalten große Mengen an Cholesterol und ein Gemisch aus verschiedenen Phospholipiden. In den Plasmamembranen vieler Säugerzellen herrschen vier Hauptgruppen von Phospholipiden vor: **Phosphatidylcholin**, **Sphingomyelin**, **Phosphatidylserin** und **Phosphatidylethanolamin**.



011: Klassen verschiedener Phospholipide

Phosphatidylserin trägt eine **negative Ladung**. Die anderen drei Phospolipide sind bei physiologischem pH-Wert elektrisch neutral, denn sie tragen je eine positive und eine negative Ladung. Zusammen machen diese vier Phospholipide bei den meisten Membranen mehr als die Hälfte der Lipidmasse aus. Andere Phospholipide, wie zum Beispiel die **Inositol-Phospholipide**, sind in geringeren Mengen vorhanden, haben jedoch sehr wichtige Funktionen bei der **Signalübertragung**.

Lipidmoleküle mit besonders bemerkenswerter Asymmetrie in ihrer Verteilung auf Zellmembranen sind die zuckerhaltigen Lipidmoleküle, die sogenannten **Glykolipide**. Sie sind ausschließlich auf der Außenseite der Lipid-Doppelschicht zu finden. Man nimmt an, daß sie sich dort zu Mikroaggregaten zusammenschließen, die über Wasserstoffbrücken-Bindungen der Glykolipid-Moleküle untereinander zusammengehalten werden. In der Plasmamembran liegen ihre Zuckergruppen auf der Zelloberfläche frei, was die Vermutung nahelegt, daß Glykolipiden eine Rolle bei den Wechselbeziehungen von Zellen mit ihrer Umgebung zukommt. Die asymmetrische Verteilung dieser Moleküle innerhalb der Lipid-Doppelschicht entsteht durch die Anheftung von Zuckergruppen an Lipidmoleküle im Lumen des **Golgi-Apparates**.

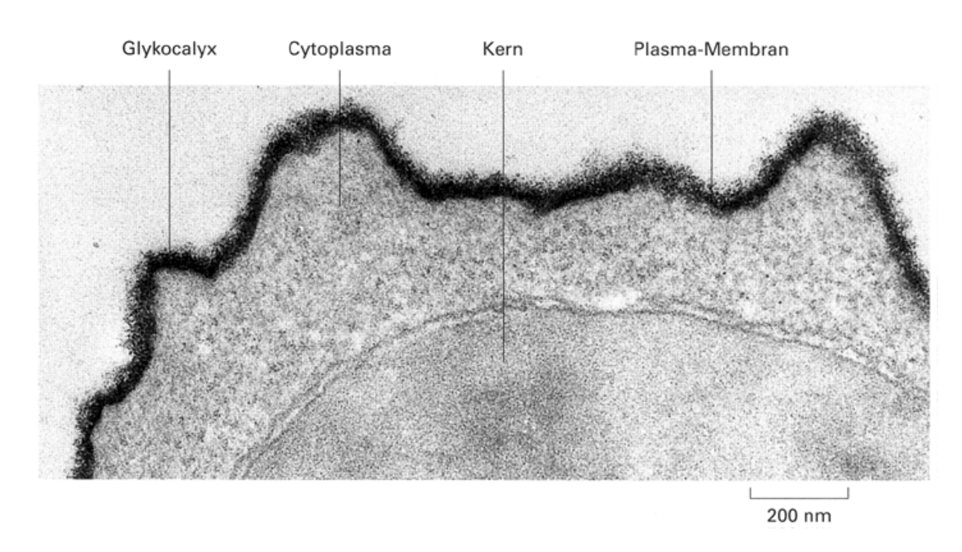


012: Phospho- und Glykolipide innerhalb der Erythrozytenmembran

Glykolipide sind in den Plasmamembranen aller tierischen Zellen zu finden; sie haben im Allgemeinen einen Anteil von etwa 5% an den Lipidmolekülen der äußeren Einzelschicht. Man findet sie auch in einigen intrazellulären Membranen. Den höchsten Grad an Komplexität unter den Glykolipiden weisen die **Ganglioside** auf. Sie enthalten **Oligosaccharide** mit einem oder mehreren **Sialinsäureresten**, durch die die Moleküle eine negative Gesamtladung tragen. Am häufigsten sind Ganglioside in der Plasmamembran von **Nervenzellen**, wo sie einen Anteil von 5 bis 10% der gesamten Lipidmasse ausmachen; sie sind jedoch in den meisten anderen Zellarten ebenfalls enthalten - wenn auch in wesentlich kleineren Mengen. Bis heute kennt man mehr als 40 verschiedene Ganglioside.

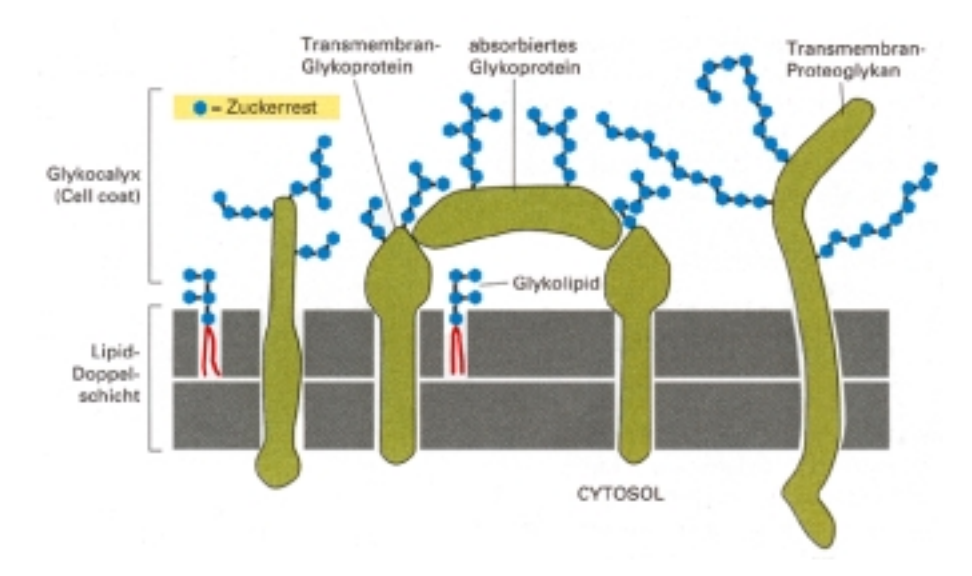
Wenn auch die Grundstruktur einer biologischen Membran aus der Lipid-Doppelschicht besteht, werden doch die meisten membranspezifischen Funktionen von **Proteinen** ausgeführt. Dementsprechend können Art und Menge der Proteine in einer Membran sehr stark variieren: die Myelinmembran, die hauptsächlich als elektrische Isolierung für die Axone von Nervenzellen dient, besteht zu weniger als 25% aus Protein; Membranen hingegen, die der Energieübertragung dienen (wie die inneren Membranen von Mitochondrien und Chloroplasten), enthalten etwa 75% Protein. Im Durchschnitt findet man einen Proteingehalt von ungefähr 50% der Membranmasse. Da Lipidmoleküle im Vergleich zu Proteinmolekülen recht klein sind, enthält eine Membran stets

wesentlich mehr Lipidmoleküle als Proteinmoleküle - in einer Membran, die zu 50% ihrer Masse aus Protein besteht, kommen auf ein Proteinmolekül etwa 50 Lipidmoleküle. Ebenso wie die Membranlipide, sind auch die Membranproteine sehr häufig mit **Oligosaccharidketten** versehen. Die äußere Zelloberfläche besteht somit zu einem großen Teil aus Kohlenhydraten, die eine sogenannte **Glykocalyx** um die Zelle bilden.



013: Glykocalyx nach Rutheniumrot-Färbung

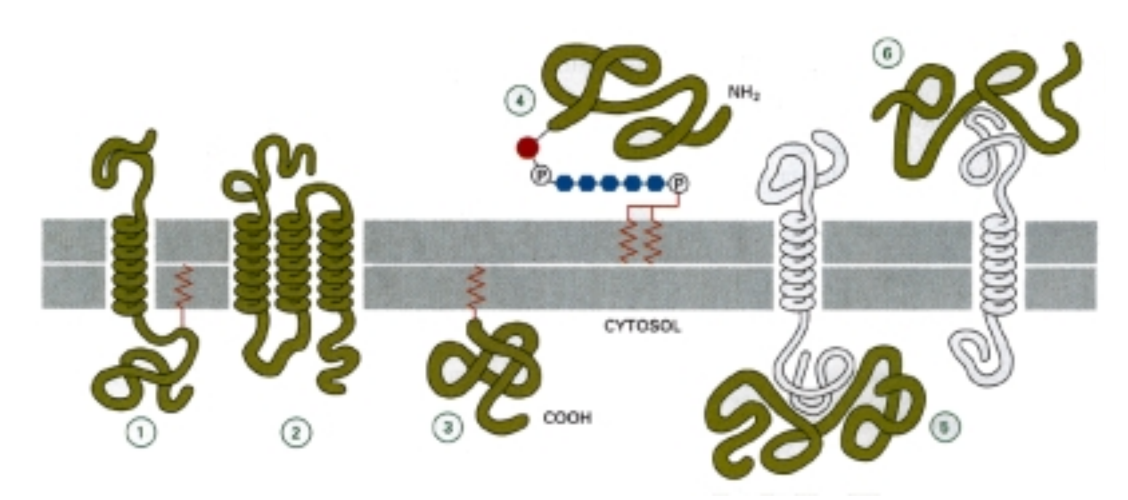
Man kann die Glykocalyx mit einer Reihe von Färbungen sichtbar machen (z.B. mit Rutheniumrot). Ein andere Technik besteht darin, "markierte" **Lektine** zu verwenden, die ebenfalls hohe Affinitäten zur Glykocalyx aufweisen. Zwar ist der Hauptanteil an Kohlenhydraten mit Molekülen verbunden, die Bestandteil der Plasmamembran sind, die Glykocalyx enthält jedoch meist auch **Glykoproteine** und **Proteoglykane**, die in den Extrazellulärraum ausgeschieden und dann an die Zelloberfläche adsorbiert wurden. Kohlenhydrate kommen als kovalent an Membranproteine (**Glykoproteine**) oder -lipide (**Glykolipide**) gebundene Oligosaccharidketten und als Polysaccharidketten integraler Membranproteoglykane vor. Im Falle der integralen Membranproteoglykane erstreckt sich der Proteinkern entweder durch die gesamte Breite der Lipid-Doppelschicht oder er ist mit der Doppelschicht über einen **Glykosyl-Phosphatidylinositol** (GPI)-Anker verbunden.



014: Die Glykocalyx im Extrazellulärraum entsteht durch Glykoproteine

Die **Oligosaccharid-Seitenketten** von Glykoproteinen und Glykolipiden sind außerordentlich vielfältig in der Anordnung ihrer Zucker. Sie enthalten zwar in der Regel **weniger** als 15 Zuckerreste, sind jedoch häufig verzweigt, und die Zucker können auf verschiedene Weise kovalent miteinander verknüpft werden. Schon drei Zuckerreste genügen, um Hunderte verschiedener Trisaccharide zu bilden. Grundsätzlich machen sowohl die Vielfalt als auch die exponierte Position von Oligosacchariden auf Zelloberflächen diese Moleküle besonders geeignet für eine funktionelle Rolle bei bestimmten Vorgängen der **Zellerkennung**. Daneben besitzt die Glykocalyx eine **Schutzfunktion** gegenüber mechanischen und chemischen Schädigungen der Zelle, sowie um Fremdkörper und andere Zellen auf eine hinreichende Entfernung zu halten, damit keine unerwünschten Protein-Protein-Wechselwirkungen auftreten. In jüngster Zeit jedoch hat man an die Plasmamembran gebundene Lektine identifiziert, die spezifische Oligosaccharide von Zelloberflächen-Glykolipiden und Glykoproteinen erkennen und dadurch in der Lage sind, eine Vielfalt an vorübergehenden **Zell/Zell-Verbindungen** zu vermitteln, unter anderem bei der Verklebung von Spermium und Ei, bei der Blutgerinnung, bei der Rezirkulation von Lymphozyten und Entzündungsreaktionen.

Unterschiedliche Membranproteine sind, wie unten abgebildet, auf unterschiedliche Weise mit der Membran verbunden. Viele Membranproteine strecken sich durch die ganze Breite der Lipid-Doppelschicht hindurch und lassen einen Teil ihrer Masse auf beiden Seiten herausragen.

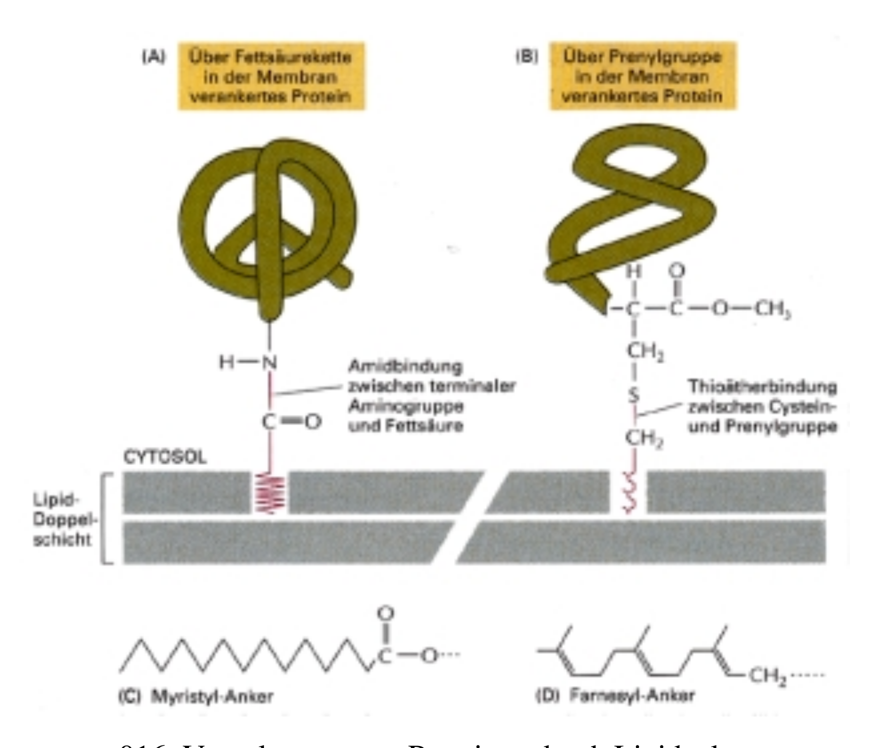


015: Verschiedene Formen von Membranproteinen

Ebenso wie die ihre Lipid-Nachbarn sind auch diese Transmembranproteine amphipathisch: sie besitzen Abschnitte, die **hydrophob** sind, und Abschnitte, die **hydrophil** sind. Ihre hydrophoben Regionen durchqueren die Membran (1, 2) und treten mit den hydrophoben Lipidmoleküle im Inneren der Doppelschicht in Wechselwirkung. Ihre hydrophilen Bereiche sind dem wäßrigem Milieu auf beiden Seiten der Membran zugewandt.

Die hydrophoben Eigenschaften werden bei einigen dieser Membranproteine zusätzlich durch die kovalente Anbindung einer Fettsäurekette verstärkt, die in das Cytoplasmablatt der Lipid-Doppelschicht eingefügt ist (1). Andere Membranproteine befinden sich vollständig im Cytoplasma und sind mit der Lipid-Doppelschicht nur durch eine oder mehrere kovalent gebundene Fettsäureketten oder über eine andere Art von Lipidketten, sog. Prenyl-Gruppen, verbunden (3). Wieder andere Membranproteine befinden sich ganz und gar außen auf der Zelloberfläche und sind mit der Lipid-Doppelschicht nur durch eine kovalente Bindung (über spezifische Oligosaccharide) mit Phosphatidylinositol in der äußeren Lipideinzelschicht der Plasmamembran verknüpft

(4). Die an Lipide gebundenen Proteine in Beispiel 3 werden als lösliche Proteine im Cytoplasma hergestellt und anschließend durch die kovalente Anheftung einer Lipidgruppe zu den Membranen gesteuert. Die Proteine aus Beispiel 4 dagegen werden als „*single pass*" Transmembranproteine im ER synthetisiert; noch im ER wird das Transmembransegment des Proteins abgespalten und ein Glykosyl-Phosphatidylinositol-(GPI)-Anker hinzugefügt, der nun das Protein in der dem Cytoplasma abgewandten Membranoberfläche allein verankert. Proteine, die über einen solchen **GPI-Anker** an die Membran gebunden sind, lassen sich gut von anderen Proteinen unterscheiden, und zwar mit einem Enzym, der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C, die diese Proteine spezifisch von ihrer Verankerung abspaltet und so aus der Membran freisetzt.



016: Verankerung von Proteinen durch Lipidanker

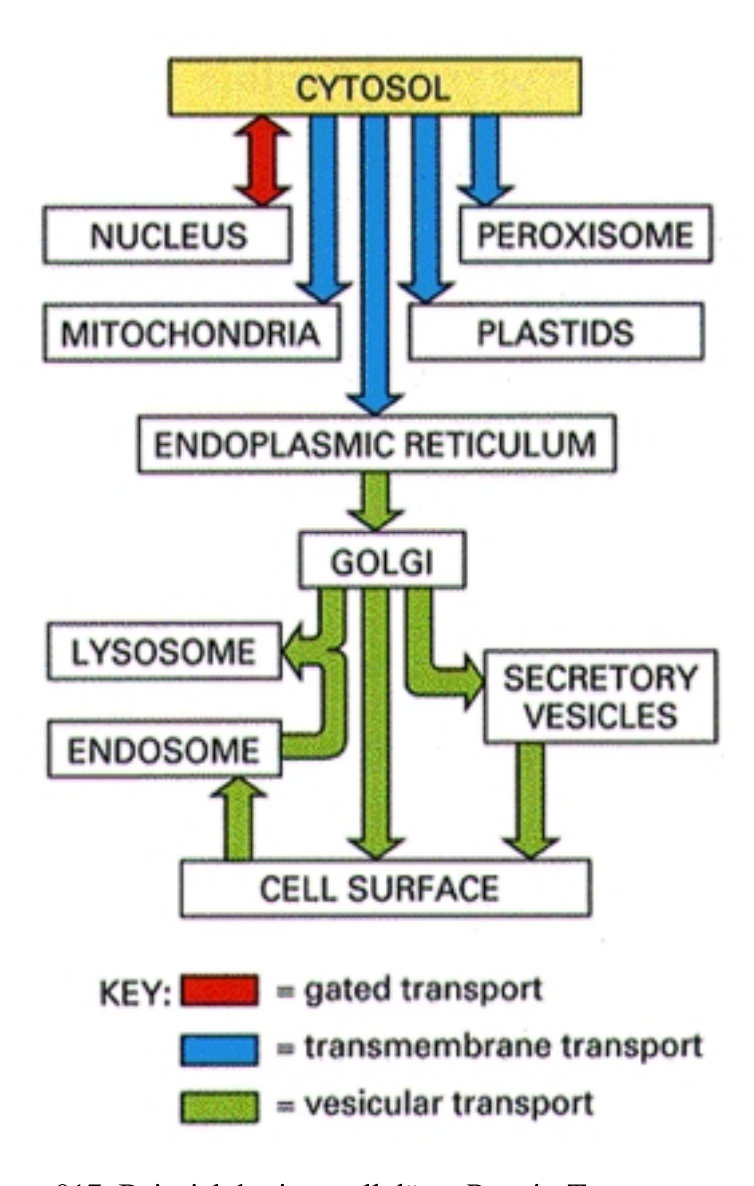
Einige andere Proteine reichen gar nicht bis in die hydrophoben Bereiche der Lipid-Doppelschicht hinein, sondern sind an einem der beiden Membranblätter über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit anderen Membranproteinen verbunden (5, 6). Viele dieser Proteine lassen sich durch verhältnismäßig schonende Extraktionsverfahren von der Membran ablösen, indem man z.B. sie Lösungen hoher oder niedriger

Ionenstärke oder auch extremen pH-Werten aussetzt; solche Bedingungen stören zwar die Wechselwirkungen der Proteine untereinander, lassen aber die Lipidschicht unversehrt. Man bezeichnet solche Proteine als **periphere Membranproteine**. Im Unterschied zu diesen können Transmembranproteine und manche anderen fest mit der Membran verknüpfte Proteine nicht auf diese Weise freigesetzt werden, man bezeichnet sie deshalb als **integrale Membranproteine**.

In aller Regel gibt die Art, wie ein Protein mit der Doppelschicht verbunden ist, Hinweise auf seine Funktion: nur Transmembranproteine können Aufgaben auf beiden Seiten der Doppelschicht wahrnehmen oder Moleküle durch die Membran transportieren. Einige **Zelloberflächenrezeptoren** zum Beispiel sind Transmembranproteine, die im Extrazellulärraum **Signalmoleküle binden** und auf der anderen Seite der Plasmamembran unterschiedliche **intrazelluläre Signale erzeugen**. Proteine, die auf nur einer Seite der Doppelschicht wirken, sind dagegen häufig ausschließlich entweder mit der betreffenden Lipid-Einzelschicht oder mit einer Proteindomäne auf dieser Seite verbunden. Einige Proteine, die mit der intrazellulären Signalübertragung zu tun haben, sind über eine oder mehrere kovalent gebundene Lipidgruppen mit der dem Cytoplasma zugewandten Oberfläche der Plasmamembran verbunden.

DES CYTOPLASMAS

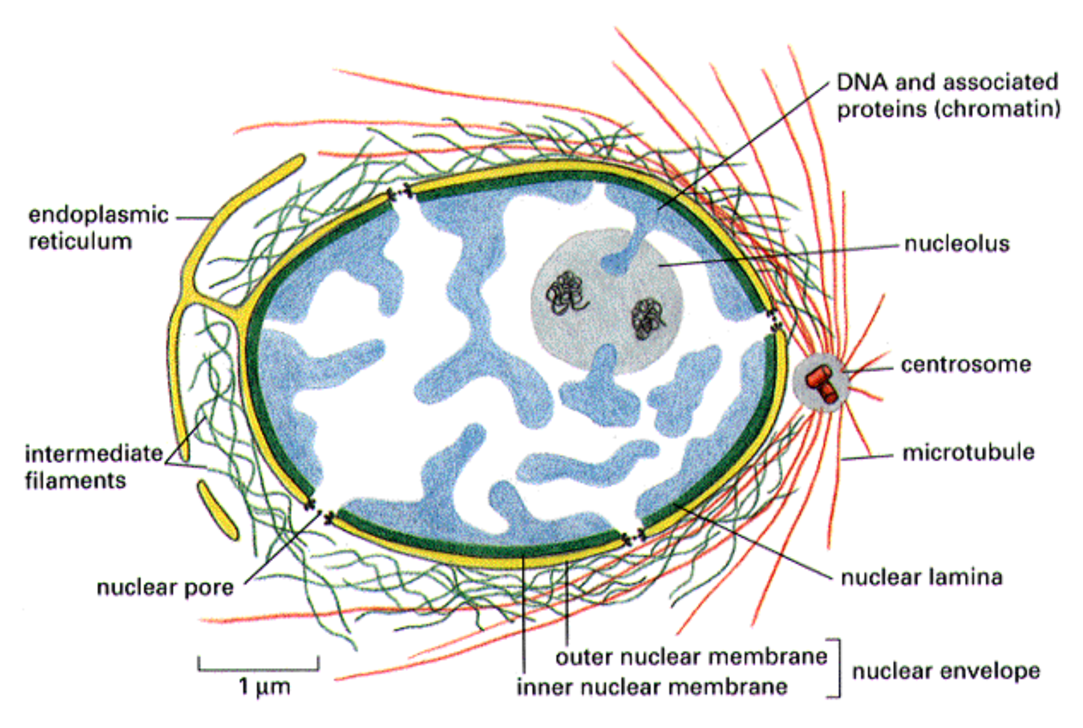
Das Cytoplasma einer Zelle macht ungefähr 50% einer Zelle aus und stellt das umgebende Milieu für alle intrazellulären Prozesse und Organellen. In diesem Milieu befinden sich **Enzyme** für **metabole** und **anabole Prozesse** und es finden die Prozesse der **Proteintranslation** und der **Signal-Transduktion** statt. Zudem finden **Transport-Prozesse** zwischen verschiedenen Organellen und Kompartimenten durch bestimmte "shuttle-Mechanismen" im Cytoplasma statt. Man unterscheidet dabei zwischen den Im- und Exportmechanismen des **Zellkerns**, den **Transmembrantransport** über sogenannte "Leader-Peptide" in einzelne Organelle und den **vesikulären Transport** zwischen verschiedenen Organellen und der Zellmembran.



017: Beispiel des intrazellulären Protein-Transports

DES ZELLKERNS

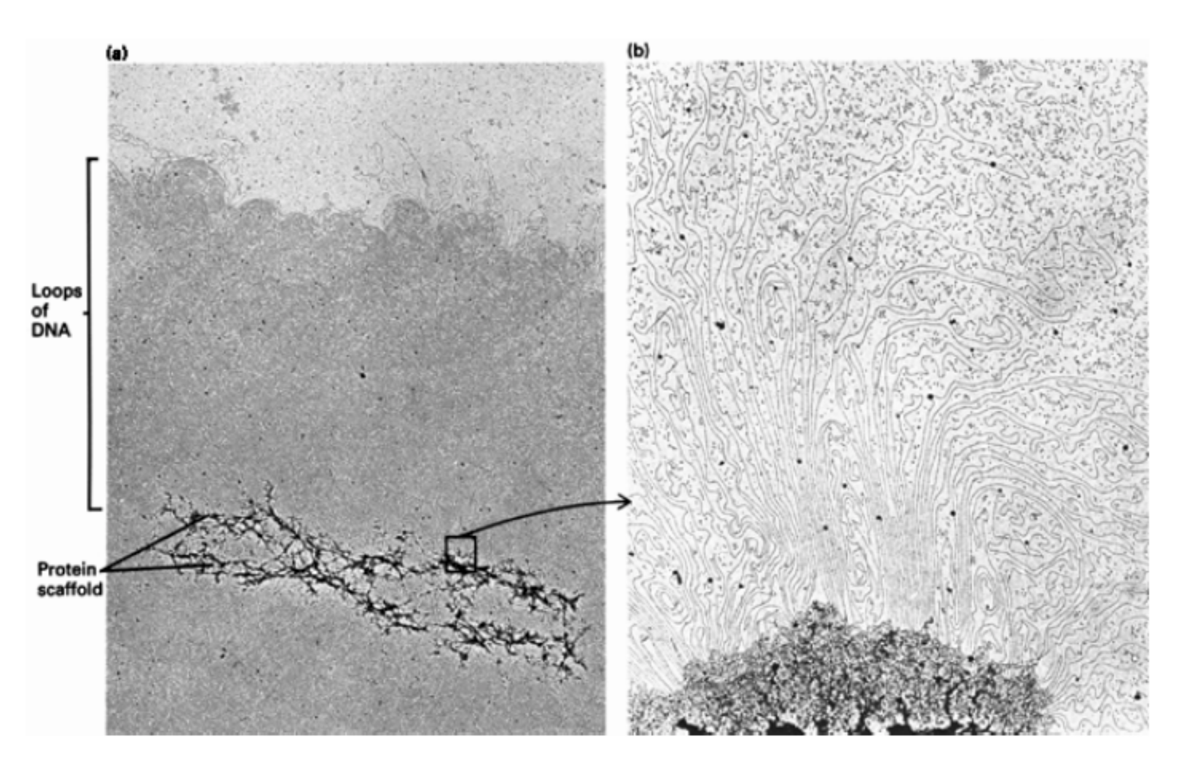
Der Zellkern nimmt ca. 10% des gesamten Zellvolumens ein und beinhaltet die nukleäre DNA einer eukaryonten Zelle. Der Zellkern ist umhüllt von einer **Doppelzellmembran**, die ins endoplasmatische Reticulum (**ER**) mündet. Unterhalb der Kernmembran befindet sich die sog. **Kernlamina**, die aus den drei Proteinen Lamin a-c aufgebaut ist und eine Art Netzwerk bildet. Die Kernmembran ist mit **Kernporenkomplexen** durchsetzt, an denen Ex- und Importprozesse stattfinden. Ausgehend von den **Zentrosomen** bilden sich Kernfasern aus **Mikrotubuli**, die an den **Centromeren** von **kondensierten Chromosomen** angreifen, und so die beiden **Schwesterchromatiden** voneinander trennen können.



018: Schematische Darstellung des Zellkerns

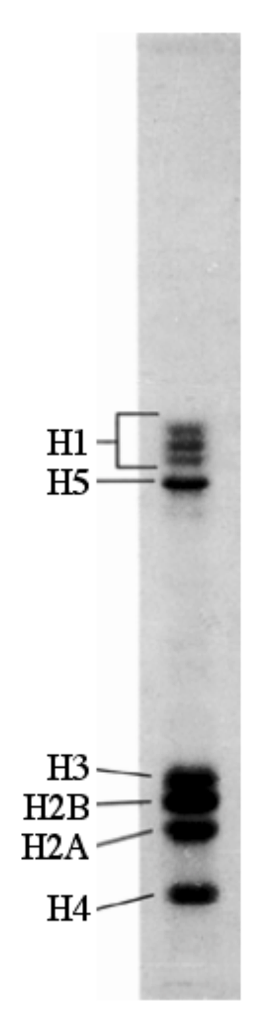
Im Zellkern selbst findet man die **genomische DNA** (gDNA) als "quasi-kristalline" Substanz, denn die Konzentration der gDNA liegt weit über ihrem Löslichkeitsprodukt. Aufgrund von experimentellen Befunden wissen wir heute, daß im Innern des Zellkern mindestens drei unterschiedliche Komponenten nachweisbar sind: das **Chromatin**, die **nukleäre Matrix** und der **Nukleolus**.

Das **Chromatin** kann in drei Komponenten unterteilt werden: (1) Chromosomengrundgerüst (fibrilläres Netzwerk), (2) die über Verankerungsproteine fixierte gDNA (Scaffold Attachment Proteins), und (3) Proteine, die wiederum an die gDNA gebunden sind.



019: Mit Jodo-Salicylat extrahierte Chromosomen: genomische DNA ist in Schlaufen über SARs an das Chromosomengrundgerüst verankert

Bei Proteinen, die an die gDNA gebunden sind, unterscheidet man prinzipiell zwei Klassen: **Histon-Proteine** und **Nicht-Histon-Proteine**. Histonproteine haben die besondere Aufgabe, die gDNA so zu verpacken, daß die negativen Ladungen des Zucker-Phosphatrückgrates kompensiert werden, und daß die gesamte Länge der fadenförmigen DNA Moleküle so verpackt wird, daß sie in den Zellkern hineinpassen. Histonproteine sind extrem basische Proteine, die zusätzlich noch unterschiedlich modifiziert sein können (Phosphorylierung; Acetylierung). Man unterscheidet die **Nukleosomen-Histone H2A, H2B, H3 und H4** von dem **Histonprotein H1**, denn nur die Nukleosomen-Histone bilden das sogenannte "**Nukleosom**" aus, um das die Doppelhelix der DNA herumgewunden wird.

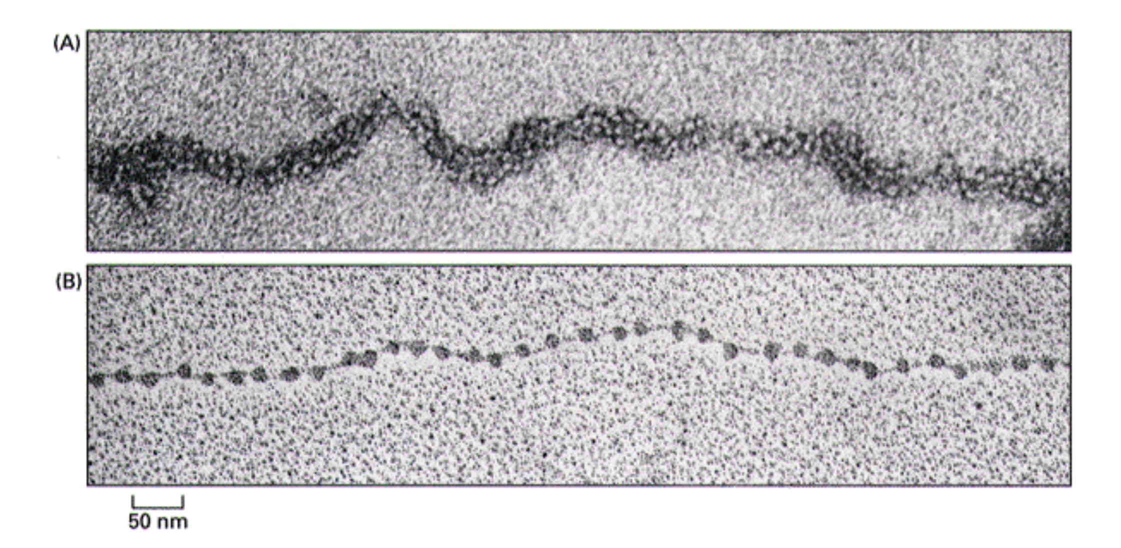


Extrahierte Histon-Proteine aus Blutzellen

- Histon-Proteine sind evolutionär extrem konserviert
- Ungefähr 60 Million Proteinkopien pro Zelle
- Histone sind kleine (102-135 As) Proteine mit hoher Dichte an positiver Ladung (Argin- & Lysin-Reste)
- Nucleosomale Histone: H2A, H2B, H3 & H4
- H1-Histone: H1 & H5 (ca. 220 As)
- Nukleosomales "Core": 2 x (H2A, H2B, H3; H4) + 146 bp DNA (1,75 x um das Core gewunden)
- H1 ist phosphoryliert und ist deshalb als 3 oder mehr Banden im Gel zu erkennen
- H5 ist spezifisch nur für Blutzellen aus Hühnern

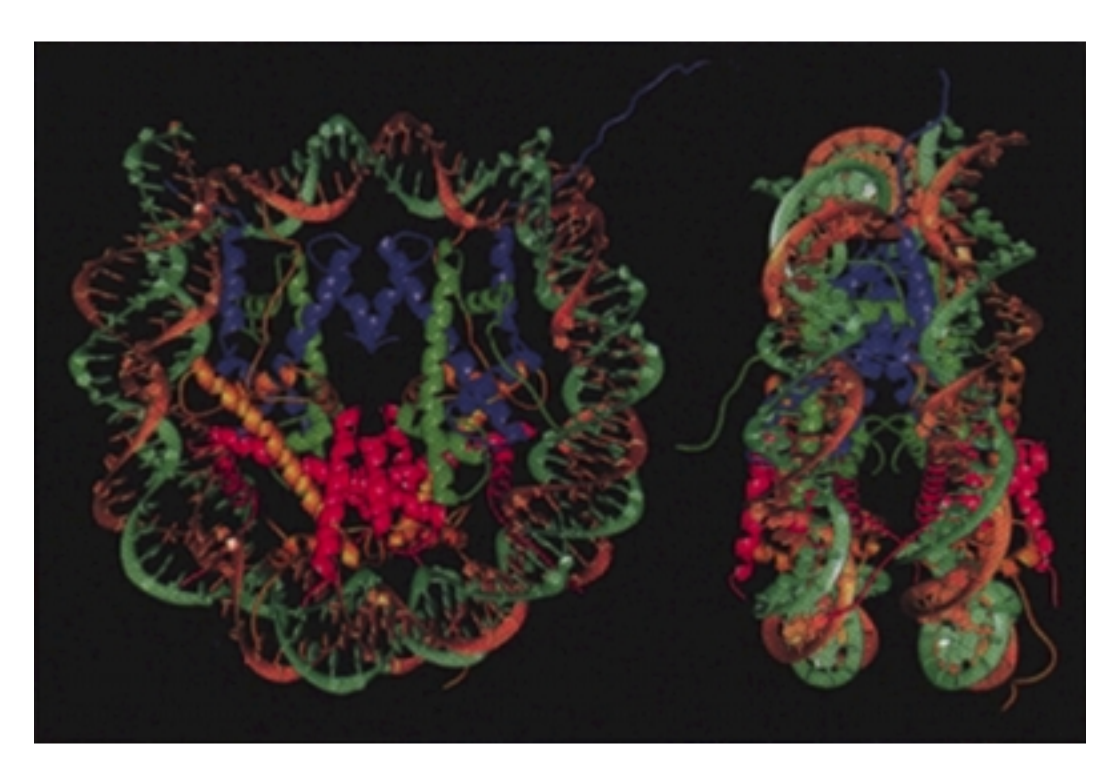
Chromatin = gDNA + gebundene Histon- und Nicht-Histonproteine

020: Westernblot Analyse von Histonproteinen aus Hühnerblut



021: Elektronenmikroskopische Aufnahme der 11 und 30 nm Faser

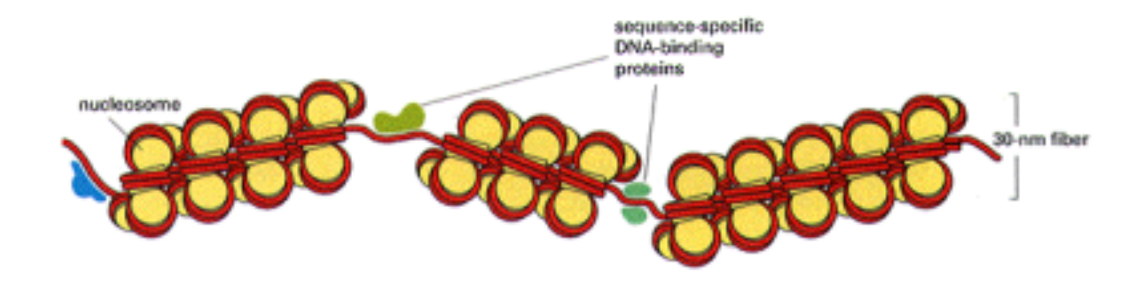
Durch Bindung der DNA an die Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 formiert sich die sog. **11 nm Faser**, eine Art **Perlschnurkette**. Dabei erstreckt sich die DNA als durchgehender doppelhelikaler Faden von Nukleosom zu Nukleosom. Jedes Nukleosom ist vom nächsten durch einen Abschnitt, die sog. "Linker-DNA", getrennt. Sie kann zwischen 0 und 80 Nukleotidpaaren (bp) variieren. Im Durchschnitt wiederholen sich die Nukleosomen in Intervallen von etwa 200 Nukleotidpaaren. Deshalb ist ein typisches Eukaryonten-Gen von 10.000 bp Länge mit etwa 200 Nukleosomen besetzt. Nach Schätzungen besitzt damit jede menschliche Zelle ca. 3×10^7 Nukleosomen.



022: Modell eines Nukleosoms mit daran gebundener helikaler DNA

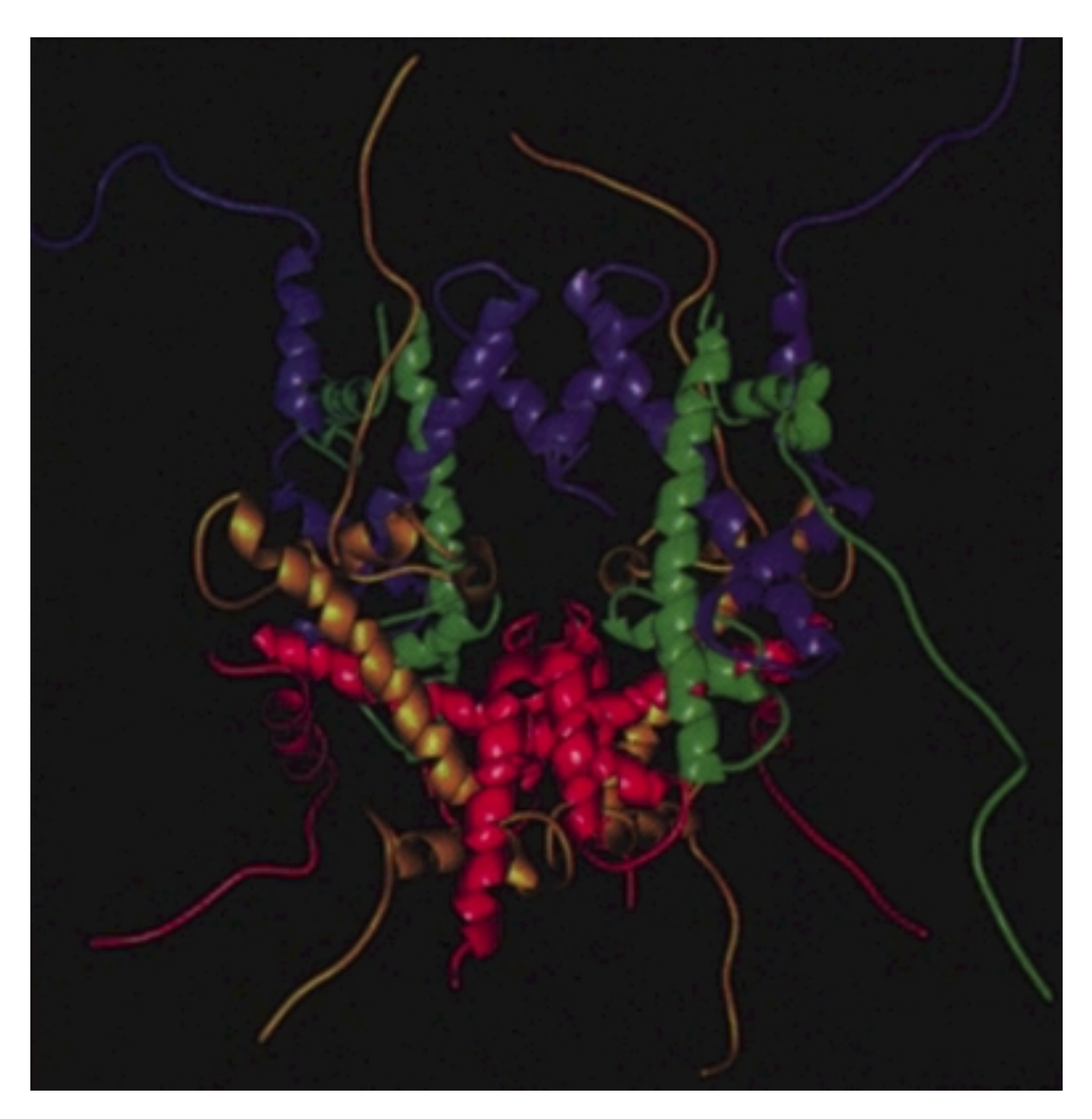
Obwohl die 11 nm Faser die Grundstruktur des Chromatins darstellt, nimmt das Chromatin in lebenden Zellen wahrscheinlich nur selten die ausgestreckte Konformation ein. Statt dessen sind die Nukleosomen aufeinander gepackt und bilden eine regelmäßige Struktur, in der die gDNA noch höher kondensiert ist. Diese Organisationsstufe ist die sog. **30 nm Faser**, das **Solenoid**. Um diese Struktur auszubilden, muß das **Histon H1 Protein** in der "Linkerregion" der 11 nm Faser binden. Unregelmäßigkeiten im Solenoid generieren sich durch die unregel-

mäßig langen “Linkerregionen” zwischen den einzelnen Nukleosomen. Deshalb findet man immer wieder Histon-freie DNA-Abschnitte im Solenoid. An diese Stellen können (un)spezifische Proteine binden, um notwendige Kontrollfunktionen für das Chromatin auszuüben. Solche Proteine können z.B. Enhancer- oder Silencer-bindende Proteine sein, Chromosomen-Verankerungsproteine, High Mobility Group (HMG) Proteine oder spezifische Proteine der Replikation oder Transkription.



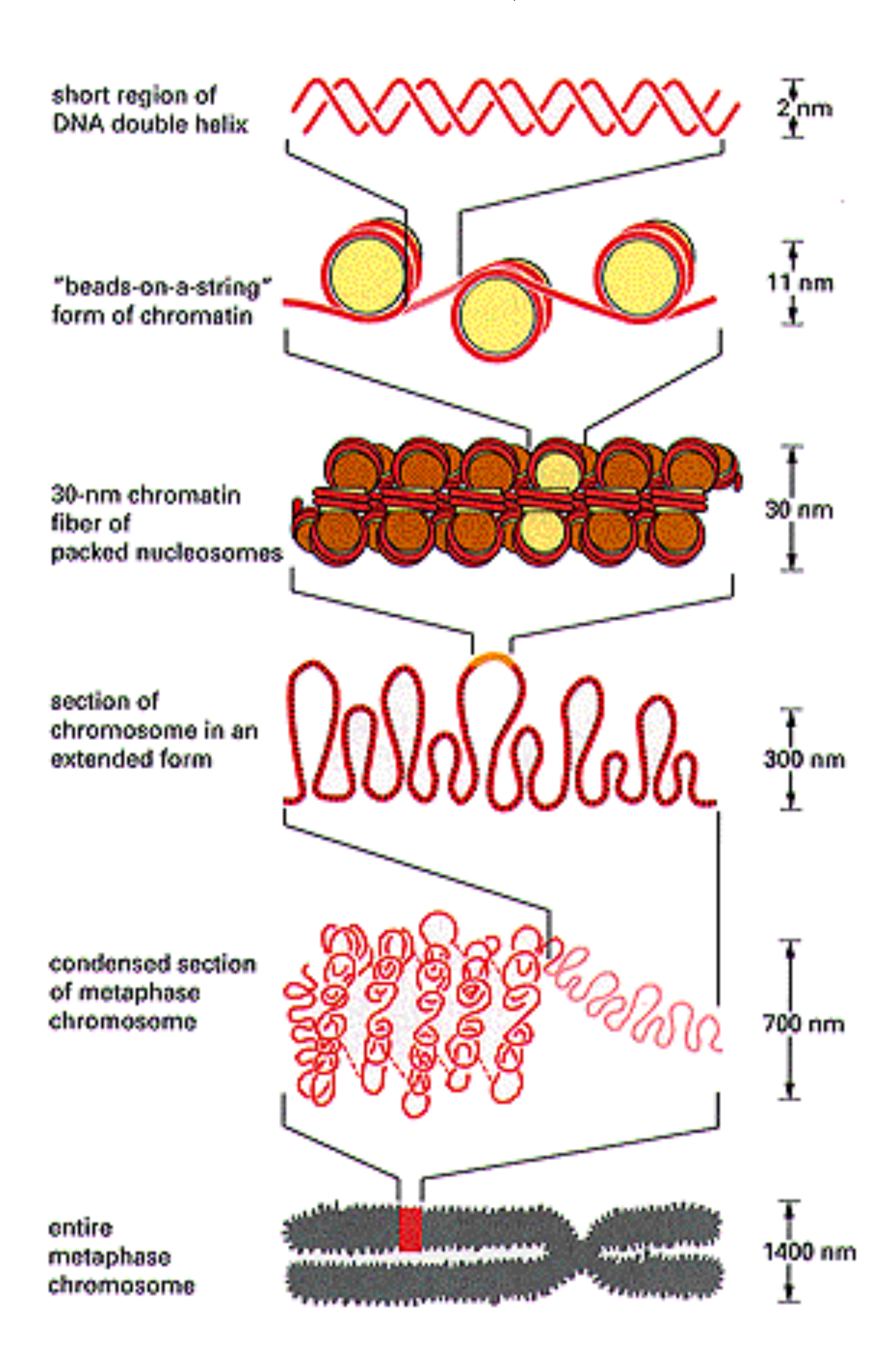
023: Das Solenoid-Model des Chromatins

Die Histonproteine des Nukleosoms haben noch eine weitere wichtige Eigenschaft. Im N-terminalen Abschnitt der einzelnen Histonproteine H2A/B, H3 und H4 (jeweils die ersten 20 Aminosäuren) befinden sich jeweils 3-4 Lysinreste, die eine positive Ladung aufweisen. Mit diesen frei beweglichen N-Termini können Histonproteine in der großen Grube der DNA Doppelhelix binden und somit die aufgewundene DNA-Doppelhelix sehr fest binden. Für bestimmte Prozesse, wie z.B. den Prozess der **Transkription**, muß diese feste Bindung wieder gelockert werden. Dies geschieht durch eine “Acetylierungs-Reaktion” der Lysinreste mittels sog. **Histon-Acetyl-Transferasen** (HAT). Acetylierte Histonproteine können im Gegenzug auch wieder “deacetyliert” werden, und zwar mittels der sog. **Histon-Deacetylasen** (HDAC). Für beide Enzymtypen gibt es mehrere Genfamilien und sie spielen eine wesentliche Rolle in der Regulation des Chromatins. Sie entscheiden über die Zugänglichkeit der DNA für spezifische Transkriptionsfaktoren, spielen eine wichtige Rolle in bestimmten Entwicklungsprozessen und sind fehlreguliert in einigen menschlichen Erkrankungen. Deshalb wird derzeit nach spezifischen Hemmstoffen für beide Enzymfamilien gesucht, weil sie wichtige Therapeutika sein könnten. Bisher bekannte Hemmstoffe, wie z.B. **Trichostatin A**, haben zu große Nebenwirkungen, um klinisch eingesetzt zu werden.



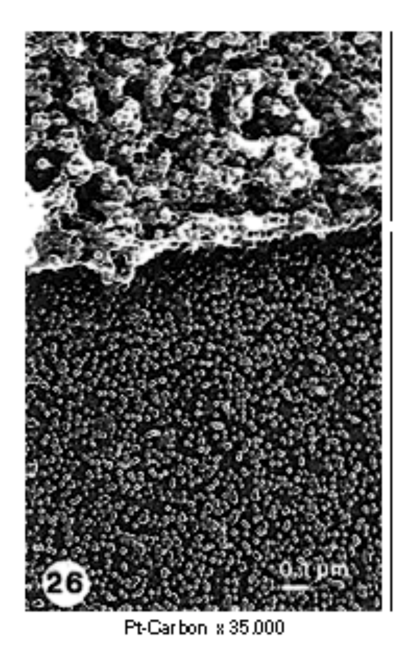
024: Nukleosomen-Komplex (Oktamer-Komplex) ohne DNA: die freien N-Termini binden in der großen Grube der DNA und binden fest an die DNA.

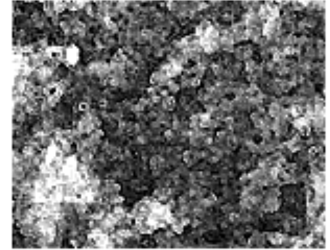
Um die gDNA im Zellkern unterzubringen, sind viele Stufen der Organisation erforderlich, um einen Kondensationsgrad zu erreichen, der es erlaubt, einen Informationsstrang von 2 nm Durchmesser und einer Länge von 1 m im Nukleus (Volumen ca. 600 μm^3) unterzubringen. Neben der Verpackung der DNA durch Nukleosomen (11 nm), müssen die Solenoidfäden (30 nm) zusätzlich in Schlaufenform am fibrillären Netzwerk des Chromosomengrundgerüstes verankert werden (300 nm). Solche Solenoidschlaufen sind im Durchschnitt 85 kb lang und können zwischen 5 und 120 kb variieren. Sie sind wiederum aufspiraliert (700 nm) und bilden die Grundeinheit von anfärbbaren Banden von Metaphasechromosomen (1400 nm).

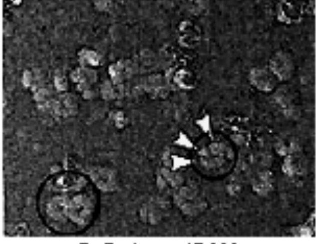


025: Organisationsformen der gDNA in eukaryonten Zellen

Die **nukleäre Matrix** besteht aus vielen kleinen Proteinkomplexen, die man als kleine Kügelchen in rasterelektronischen Aufnahmen ausmachen kann. In diesen kleinen Kompartimenten der nukleären Matrix laufen alle uns derzeit bekannten Prozesse des Zellkerns ab: **Replikation**, **Transkription**, **Spleißen**, **Capping**, **poly-Adenylierung**, **Prozesse der Genregulation**, **Kontrolle des Zellzyklus**, **DNA-Reparaturprozesse**, **nukleärer Transport** usw. Einige dieser Prozesse werden im Laufe dieses Demonstrationspraktikums noch ausführlich besprochen werden.



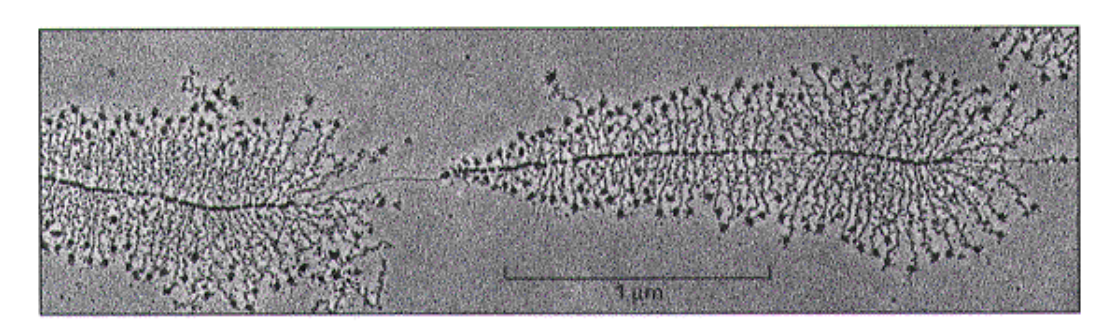




026: REM Aufnahmen von präparierter, nukleärer Matrix und seiner Substrukturen

Der **Nukleolus** ist eine Ribosomenbaumaschine, denn dort werden die RNA Komponenten der Ribosomen hergestellt (rRNA) und mit importierten ribosomalen Proteinen assembliert. Der Nukleolus enthält 10 große DNA-Schleifen, die von **10 Chromosomen** in den Nukleolus hineinragen. Jedes dieser Chromosomen enthält einen "Cluster" von **rRNA-Genen**. Die rRNA-Gene werden mit hoher Geschwindigkeit durch **RNA-Polymerase I** transkribiert. Der Beginn der rRNA-Verpackung kann in elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Gene während der Transkription gesehen werden: das 5'-Ende eines jeden

Transkripts ist von einem **proteinreichen Körnchen** eingeschlossen (s.u.).



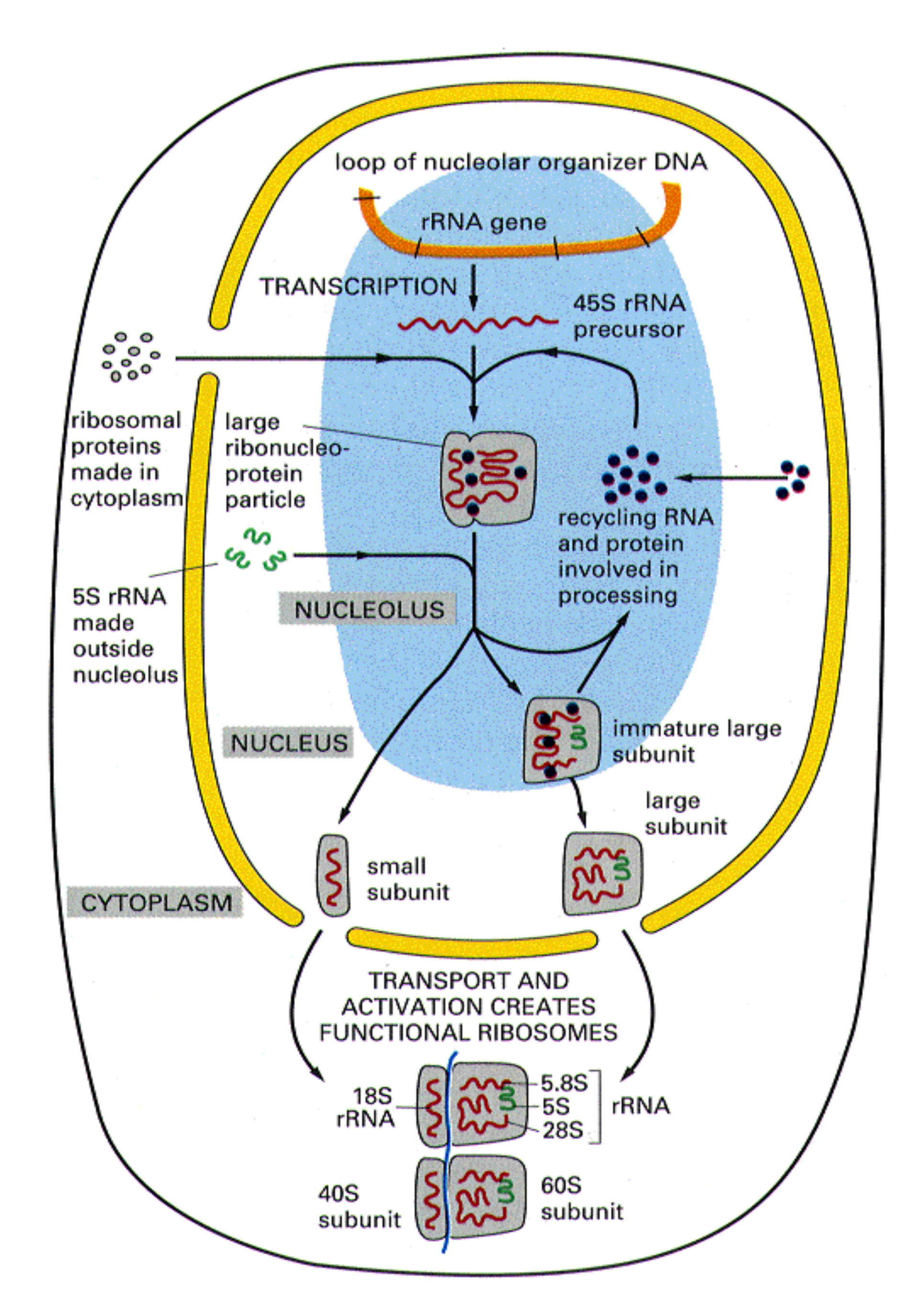
027: Kontinuierliche Transkriptions von zwei hintereinander liegenden ribosomalen Transkriptionseinheiten durch RNA Polymerase I: deutlich sind erste Assemblierungen am 5'-Ende der naszierenden rRNA Transkripte zu erkennen.

Durch Markierungsexperimente mit ^{3}H-Uridin kann verfolgt werden, daß ein **45S-Transkript** zunächst in einen großen Protein-Komplex verpackt wird, der viele verschiedene Proteine enthält, die vom Cytoplasma, wo alle ribosomalen Proteine synthetisiert werden, importiert werden. Die meisten der 80 verschiedenen Polypeptidketten, die das Ribosom bilden, werden zusammen mit der 5S-rRNA in diesem Stadium eingebaut.

Andere Moleküle sind erforderlich, um die 45S-rRNA zu bearbeiten und den Montage-Prozeß zu steuern. So enthält der Nukleolus auch andere RNA-bindende Proteine und gewisse kleine **Ribonucleoprotein-Partikel**, die dazu beitragen, den Zusammenbau der Ribosomen zu katalysieren.

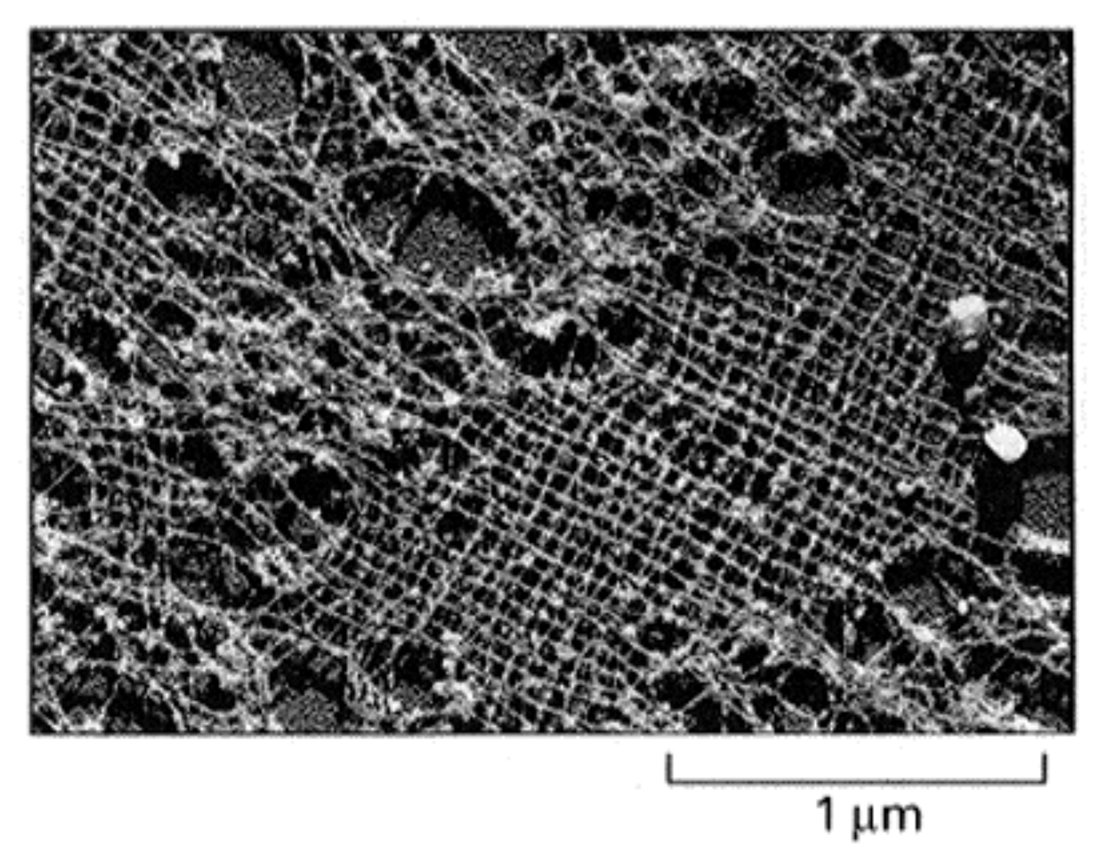
Diese Komponenten verbleiben im Nukleolus, wenn die fertiggestellten ribosomalen Untereinheiten durch die **Kernporenkomplexe** in das Cytoplasma exportiert werden. Innerhalb von 30 Minuten treten die ersten **kleinen ribosomalen Untereinheiten** (40S) einschließlich ihrer 18S-rRNA aus dem Zellkern aus und lassen sich im Cytoplasma nachweisen. Der Zusammenbau der **großen ribosomalen Untereinheiten** (60S) einschließlich ihrer 28S-, 5,8S- und 5S-rRNAs nimmt ungefähr eine Stunde in Anspruch. Die letzten Schritte der Ribosomenreifung finden erst dann statt, wenn diese Untereinheiten in das Cytoplasma

transportiert worden sind. Diese Verzögerung verhindert, daß funktionelle Ribosome Zugang zu den noch unvollständigen hnRNA-Molekülen (ungespleißte RNA Moleküle) im Zellkern erhalten. Außerdem gehen die Untereinheiten der Ribosomen erst nach dem Kern-Export durch einen Kernporenkomplex in ihre aktive Form über.



028: Die aktive Form der beiden Ribosomen-Untereinheiten werden erst nach dem Kernexport durch einen Kernporenkomplex im Cytoplasma gebildet.

Der Transport von Molekülen in den und aus dem Zellkern ist ein strikt regulierter Prozess. Die Kernhülle umschließt die DNA und definiert das nukleäre Kompartiment. Sie wird aus zwei Membranen gebildet, die in das ER übergehen. Obwohl die innere und die äußere Kernmembranen ineinander übergehen, enthält jede der Membranen eine ihr eigene Proteinzusammensetzung. Unterhalb der inneren Kernmembran befinden sich die Kernlamine, die eine filzähnliche **Kernlamina** ausbilden, um die Kernmembran zu stützen.

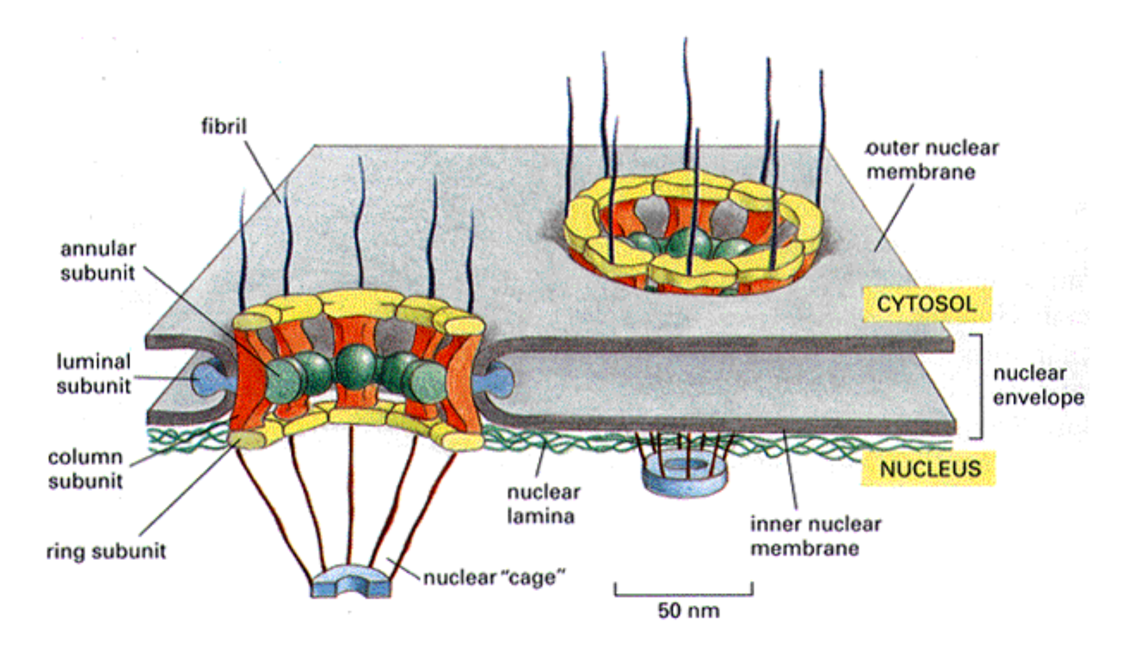


029: Die Kernlamina wird aus den Proteinen Lamin a-c gebildet

Die Kernlamina ist ein maschenförmiges Gebilde, das aus untereinander vernetzten Proteinuntereinheiten, den **Kernlaminen a-c**, besteht. Die Kernlamine gehören zu einer besonderen Klasse von Intermediärfilamenten, die durch Polymerisation ein **zweidimensionales Geflech**t ausbilden können. Vermutlich ist die Kernlamina für die Formgebung und Stabilisierung der Kernhülle verantwortlich, mit der sie über Verankerungen in den Kernporenkomplexen und der inneren Membran verbunden ist. Da auch das Chromatin mit der Kernlamina interagiert,

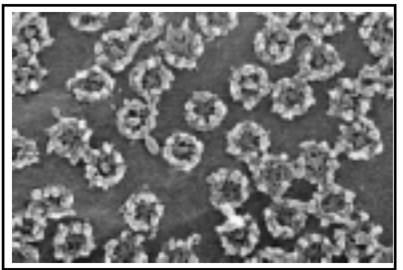
stellt sie die strukturelle Verbindung zwischen DNA und Kernhülle her. Zwischen dem Kern und dem Cytoplasma findet ein **ständiger Austausch** in beide Richtungen statt. Die vielen Proteine, die - wie **Histone**, **DNA-** und **RNA-Polymerasen**, **genregulatorische** und **RNA-prozessierende Proteine** - ihre Funktion im Kern ausüben, werden selektiv aus dem Cytoplasma, wo sie gebildet werden, in das nukleäre Kompartiment eingeschleust. Gleichzeitig werden tRNA und mRNA im nukleären Kompartiment synthetisiert und in das Cytoplasma entlassen. Wie der Import ist auch der Export selektiv: mRNAs werden zum Beispiel erst dann heraustransportiert, wenn sie im Kern durch RNA-Bearbeitungsabläufe (Capping, poly-Adenylierung und Spleißen) korrekt modifiziert worden sind.

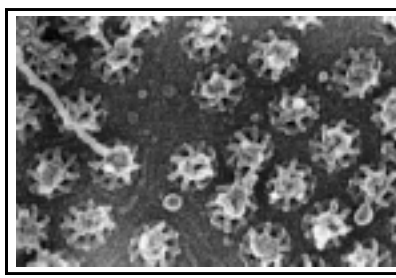
In allen Eukaryonten - von der Hefe bis zum Menschen - wird die Kernhülle durch **Kernporen** perforiert. Jede Pore besteht aus einer komplizierten Struktur, die als **Kernporenkomplex** bekannt ist, dessen molare Masse auf ungefähr 125 Millionen Da geschätzt wird. Er ist aus vermutlich mehr als 100 Proteinen zusammengesetzt, die in einer eindeutig achtfachen Symmetrie angeordnet sind.



030: Anordnung des Kernporenkomplexes in der Kernmembran

Nuclear pore complex



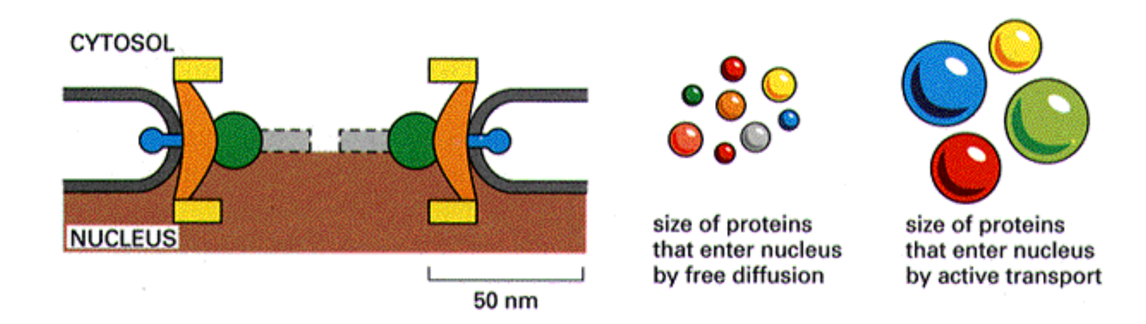


031: REM-Aufnahme des Kernporenkomplexes: außen und innen

Jeder Kernporenkomplex enthält einen oder mehrere offene wässrige Kanäle, durch die wasserlösliche Moleküle, die nicht zu groß sind, passiv diffundieren können. Die tatsächliche Größe dieser Kanäle wurde dadurch bestimmt, daß man markierte Moleküle unterschiedlicher Größe in das Cytoplasma injizierte und untersuchte, wie schnell solche Moleküle in den Kern gelangen:

Kleine Moleküle (5 KDa und weniger)	frei durchlässig
17 KDa	2 Minuten
44 KDa	30 Minuten
Globuläre Proteine > 60 KDa	kein Durchtritt

Die quantitative Auswertung solcher Ergebnisse legt nahe, daß der Kernporenkomplex die freie Diffusion von kleinen Molekülen durch einen **wassergefüllten, zylindrischen Kanal** ermöglicht, der einen Durchmesser von ungefähr 9 nm hat und etwa 15 nm lang ist; ein solcher Kanal würde nur einen kleinen Teil des gesamten Porenvolumens in Anspruch nehmen.



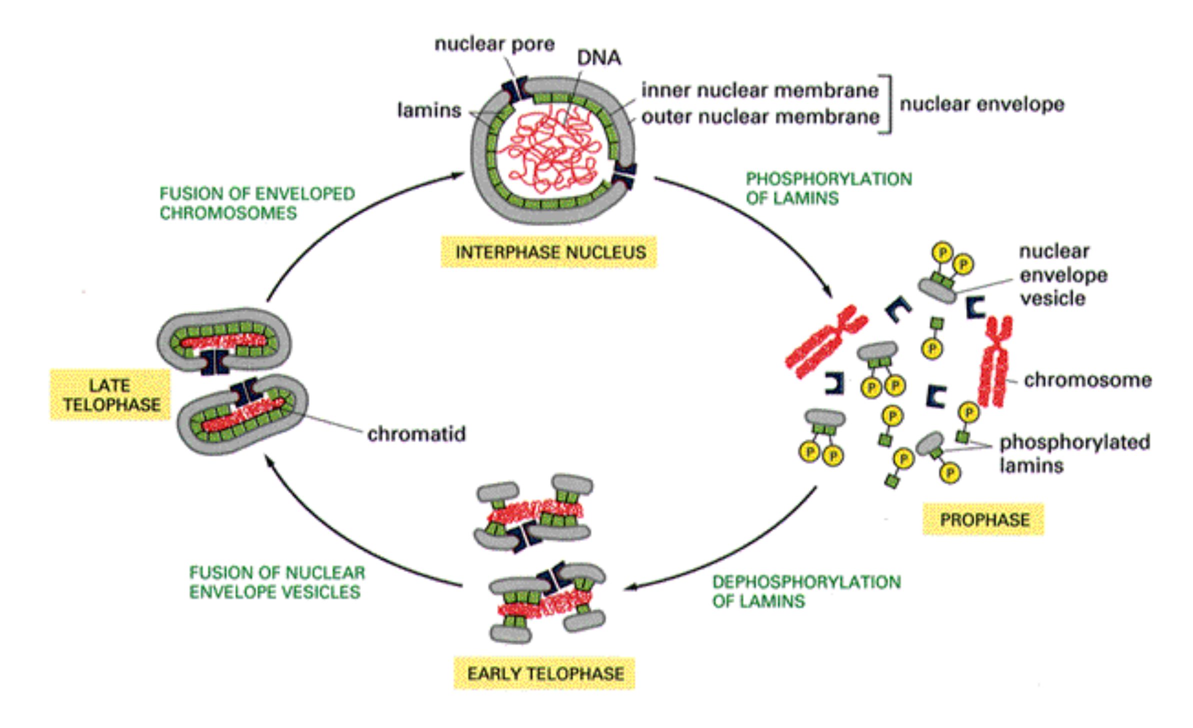
Die Kernhülle trägt dazu bei, daß im nukleären Kompartiment und im Cytoplasma die jeweils spezifische Zusammensetzung an Proteinen aufrechterhalten werden kann, da viele zelluläre Proteine zu groß sind, um über Diffusion durch die Kernporen zu gelangen. Zum Beispiel haben reife Ribosomen einen Durchmesser von ungefähr 30 nm und können nicht über Diffusion die 9 nm breiten Kanäle passieren. Aber wie gelangen neugebildete Ribosomenuntereinheiten aus dem Kern in das Cytoplasma? Wie gelangen große Moleküle wie DNA- und RNA-Polymerasen, deren Untereinheiten eine molare Masse von 100 bis 200 KDa haben, vom Cytoplasma in den Kern? Alle Proteine bzw. RNA-Moleküle müssen dazu an **spezifische Rezeptorproteine** binden, die sich im Kernporenkomplex befinden, und werden mit Hilfe dieses Komplexes aktiv durch die Kernmembran transportiert. Zudem haben alle Protein(komplex)e eine spezifische Signatur, die sog. **Kernlokalisationssequenz** (NLS), die ihren Import in den Nukleus garantiert. Gleiches gilt auch für den Export: dazu benötigen die Proteine eine **Kernexportsignatur** (NES).

Während der Zellteilung widerfährt dem Zellkern ein einzigartiges Schicksal: er löst sich vollständig auf und bildet sich nach der Zellteilung wieder neu. Wenn der Kern sich in der Mitose auflöst, depolymerisiert die Kernlamina, was zumindest zum Teil durch die zu Beginn der Mitose stattfindende **Phosphorylierung der Lamine** ausgelöst wird. Gleichzeitig **zerfallen die Kernporenkomplexe** in ihre einzelnen Bestandteile. Vermutlich ist die Depolymerisation der Kernlamina eine Voraussetzung dafür, daß die Kernmembran in kleine Vesikel zerfallen kann, die sich dann, zusammen mit den Kerninhalten, über das ganze Cytoplasma verteilen.

Der Wiederaufbau der Lamina erfolgt, wenn die **Lamine dephosphoryliert** werden; dadurch können sie an der Oberfläche von Chromosomen repolymerisieren. Die wiederaufgebaute Lamina bindet die **Kernhüllenmembran-Vesikel**, die dann miteinander verschmelzen und neue Hüllen um einzelne oder um Gruppen von Chromosomen bilden. Während dieses Vorgangs setzen sich auch die Bestandteile der Kernporenkomplexe wieder zusammen. Die umhüllten Chromosomen nähern sich einander an, so daß es zu einer Verschmelzung der Membranen kommt. Auf diese Weise entsteht eine **aktive Kernhülle**, die

alle jene Proteine aktiv importiert, die eine **Kernlokalisationssequenz** besitzen. Da die neue Kernhülle so eng an die Oberfläche der Chromosomen anliegt, werden nur solche zellulären Proteine, die am mitotischen Chromosom gebunden sind, mit in den Kern eingeschlossen; alle anderen bleiben im Cytoplasma. Daher kommen im Interphasekern keine großen Proteine vor, es sei denn, sie weisen Kernlokalisationssequenzen auf.

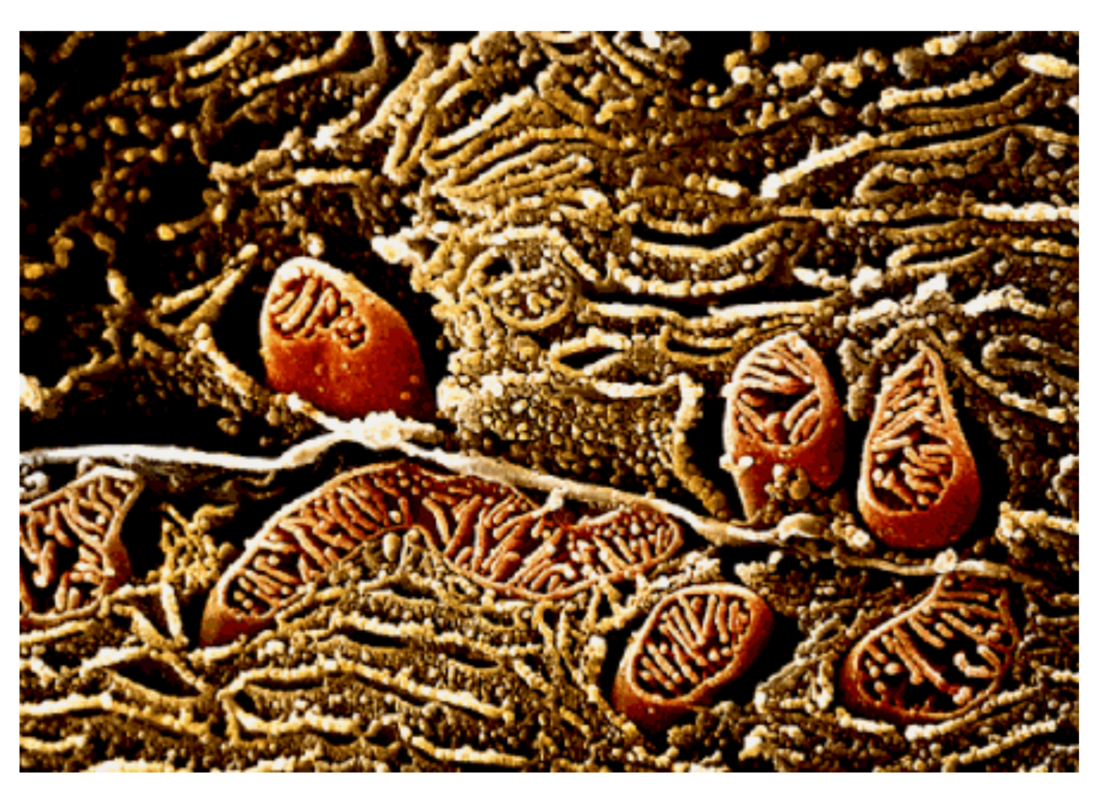
Kernlokalisationssequenzen werden nach abgeschlossenem Transportprozeß nicht abgespalten, wahrscheinlich, weil Kernproteine nach jeder Zellteilung, also mehr als einmal, importiert werden müssen. Ist dagegen ein Proteinmolekül mittels eines **Signalpeptids** einmal in eines der anderen membranumschlossenen Organelle gelangt, so wird es als Teil dieses Organells von Generation zu Generation weitergegeben und muß nicht noch einmal importiert werden; das Signalpeptid solcher Moleküle wird nach abgeschlossenem Translokationsprozeß entfernt.



032: Lebenszyklus von Zellkernen innerhalb der Mitose

DER MITOCHONDRIEN

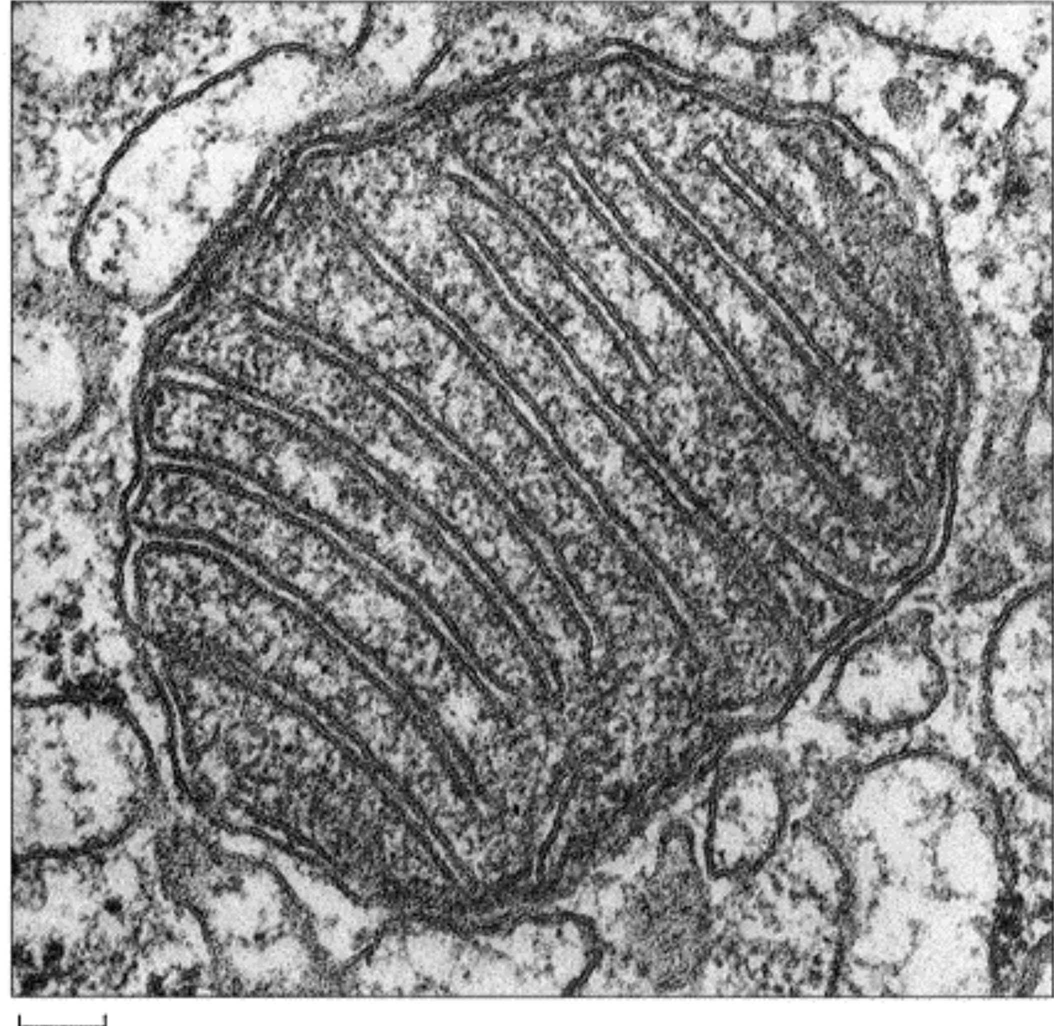
Mitochondrien nehmen einen beträchtlichen Teil des cytoplasmatischen Volumens einer Eukaryontenzelle in Anspruch und sind für die Evolution komplexerer Lebewesen unerläßlich. Ohne Mitochondrien wären alle heutigen tierischen Zellen für ihren gesamten ATP-Bedarf auf **anaerobe Glykolyse** angewiesen. Wird Glucose jedoch durch die Glykolyse zu Pyruvat abgebaut, wird nur ein sehr kleiner Teil der gesamten, potentiell aus Glucose nutzbaren Freien Energie verfügbar. In den Mitochondrien wird der Zuckerstoffwechsel zuende geführt: **Pyruvat** wird in die Mitochondrien transportiert und dort durch **molekularen Sauerstoff** (O_2) zu **CO_2 und H_2O** oxidiert. Die dabei freigesetzte Energie wird so effektiv genutzt, daß bei der Oxidation eines Glucose-Moleküls ca. 36 Moleküle ATP entstehen. Bei der Glykolyse hingegen werden nur 2 Moleküle ATP produziert.



033: REM (Fehlfarben)-Aufnahme von zellulären Mitochondrien

Mitochondrien werden in der Regel als steife längliche Zylinder mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1 μm dargestellt. Zeitrafferaufnahmen lebender Zellen jedoch machen deutlich, daß Mitochondrien ausgesprochen bewegliche und **verformbare Organellen** sind, die ihre Ge-

stalt ständig ändern; sie fusionieren sogar miteinander und trennen sich wieder. Trotz hinreichender Größe und guter Sichtbarkeit im Lichtmikroskop wurden wesentliche Fortschritte im Verständnis ihrer Funktionsweise erst 1948 erzielt, als man Methoden entwickelt hatte, um intakte Mitochondrien zu isolieren. Zellen, die sehr viel Energie aufbringen müssen, enthalten deutlich mehr Mitochondrien und diese sind zumeist direkt an die entsprechenden Energieverbraucher gekoppelt (z.B. in der Muskelzelle). Eine Leberzelle enthält zwischen 1.000 bis 2.000 Mitochondrien, das entspricht etwa einem Fünftel ihres Zellvolumens.



034: Struktur eines Mitochondriums: Oberfläche der inneren Membran ist um ein Vielfaches größer als die Oberfläche der äußeren Membran

Ebenso wie der Zellkern, ist jedes Mitochondrium von zwei hochspezialisierten Membranen umgeben, die für seine Aktivitäten von entscheidender Bedeutung sind. Zusammen bilden sie zwei getrennte Mitochondrien-Kompartimente: den **inneren Matrixraum** und einen wesentlich engeren **Intermembranraum** (Zwischenmembranraum).

Die **Matrix** enthält ein hochkonzentriertes Gemisch aus Hunderten von Enzymen, darunter auch diejenigen, die für die **Oxidation von Pyruat und Fettsäuren** und für den **Zitronensäure-Zyklus** benötigt werden. Sie enthält außerdem mehrere identische Kopien des **mitochondrialen DNA-Genoms**, spezielle **mitochondriale Ribosomen**, **tRNAs** und verschiedene **Enzyme** für die Expression der Mitochondrien-Gene. Dies ist der Raum eines Mitochondriums, der die Hauptarbeit leistet.

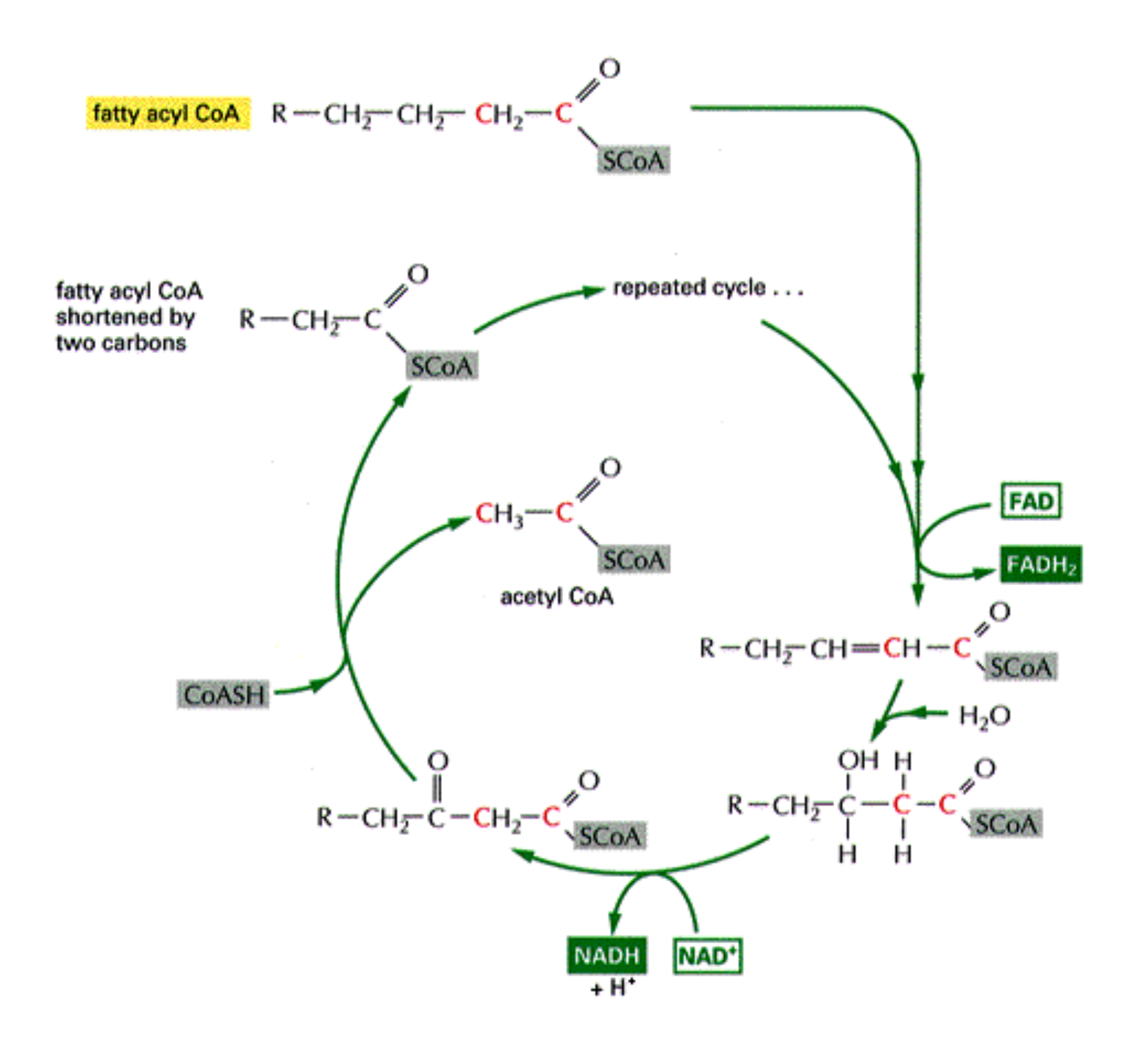
Die **Innenmembran** ist in zahlreiche **Cristae** gefaltet, die ihre Gesamtoberfläche vergrößern. Sie enthält **Proteine** aus drei verschiedenen Funktionskreisen: (1) diejenigen, die die **Oxidationsreaktionen der Atmungskette** durchführen, (2) einen Enzymkomplex namens **ATP-Synthase**, der in der Matrix ATP herstellt, und (3) spezifische **Transportproteine**, die die Passage von Metaboliten in die Matrix hinein und aus der Matrix heraus regulieren. Da über der Membran ein elektrochemischer Gradient errichtet wird, der die ATP-Synthase antreibt, ist es wichtig, daß die Membran für die meisten kleinen lonen undurchlässig ist. Dies wird durch die Anwesenheit von großen Mengen an **Cardiolipin** gewährleistet, ein Doppel-Phospholipid mit 4 Fettsäure-Estern. Je höher der Energieanspruch einer Zelle ist, umso mehr Cristae sind in den entsprechenden Mitochondrien zu finden (Beispiel: Herzzelle und Leberzelle: Verhältnis der Cristae 3:1).

Die **Außenmembran** enthält große kanalbildende Proteine, die **Porine** genannt werden. Deshalb ist sie für alle Moleküle von 5 KDa und darunter durchlässig. Zu den anderen Proteinen in dieser Membran gehören Enzyme der **mitochondrialen Lipid-Synthese** und Enzyme, die Lipid-Substrate in Formen umwandeln, die dann in der Matrix verarbeitet werden. Spezifische Prozesse für den **programmierten Zelltod** finden ebenfalls hier statt (siehe Seite 151ff).

Der **Intermembranraum** enthält mehrere **Enzyme**, die das aus der Matrix entlassene ATP zur Phosphorylierung anderer Nucleotide verwenden. Durch die Porine der Außenmembran ist der Intermembranraum dem Cytoplasma bezüglich kleinerer Moleküle äquivalent.

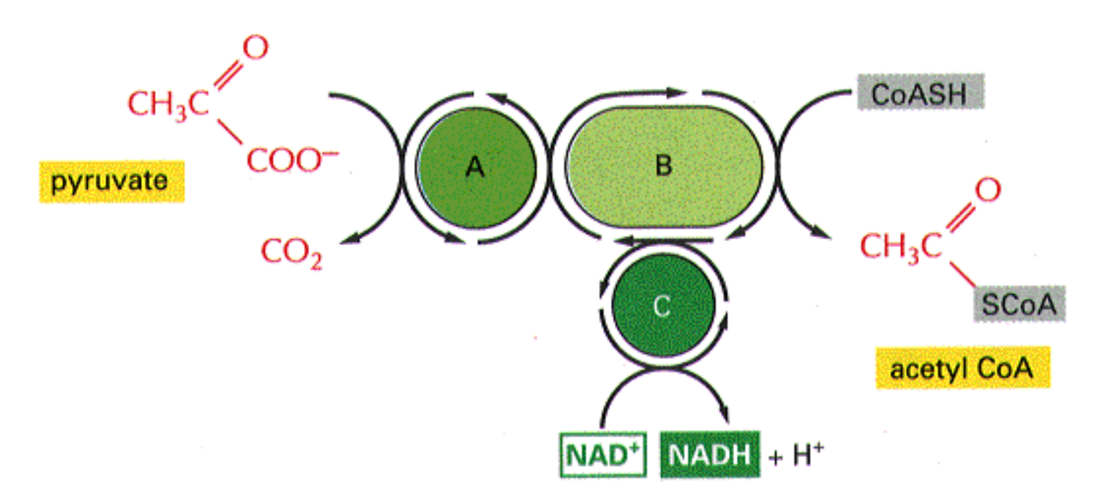
Rekapitulation der Prozesse in der mitochondriellen Matrix

Fettsäure-Oxidation:



035: Durch die Fettsäure-Oxidation können Fettsäureketten um jeweils zwei C-Atome verkürzt werden. Bei jedem Zyklus wird Energie in Form der Reduktionsäquivalente $FADH_2^+$ und $NADH_2^+$ zur Verfügung gestellt.

Oxidation von Pyruat

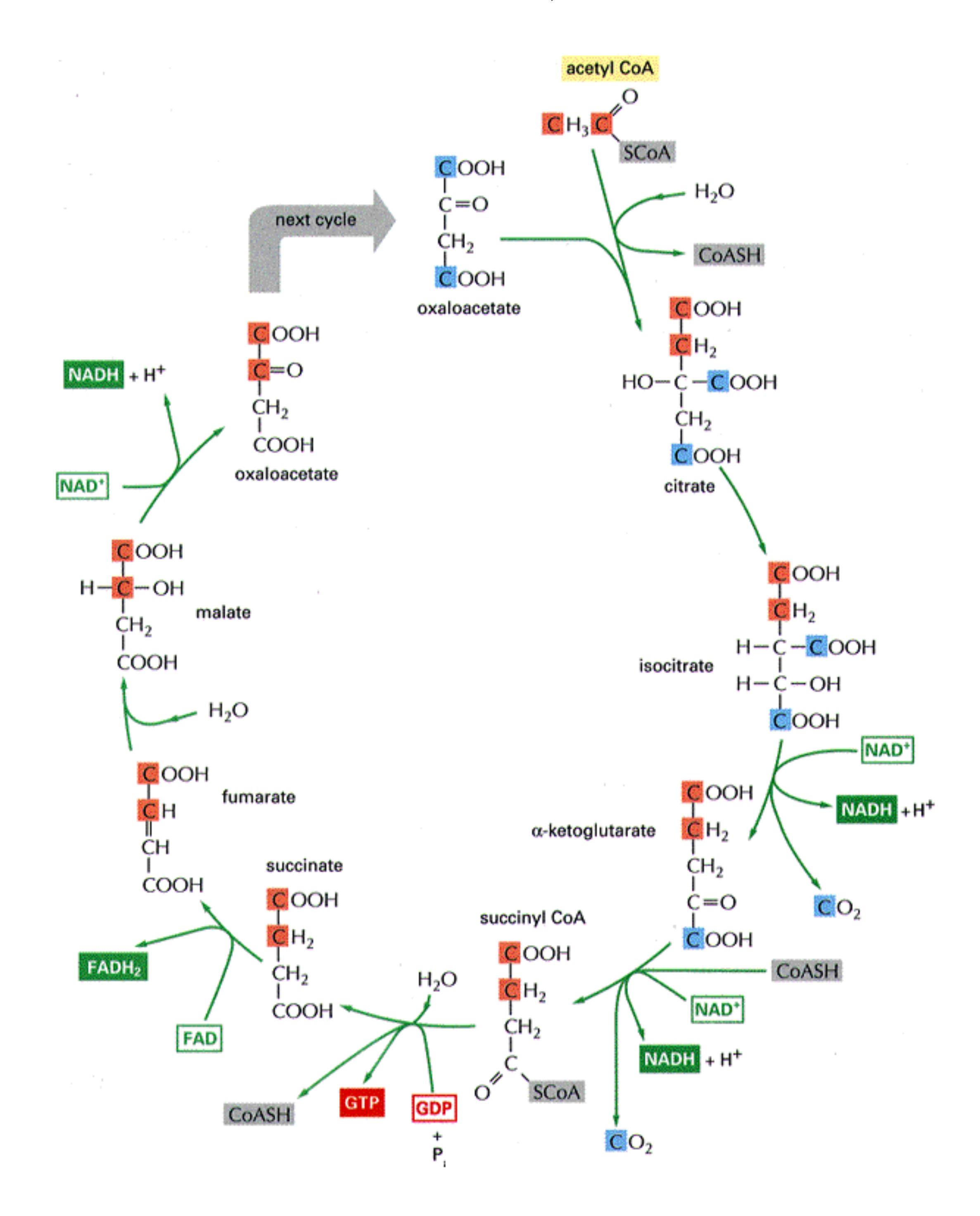


036: Dieser Enzym-Komplex wandelt in der mitochondriellen Matrix Pyruvat in Acetyl-CoA um. Auch bei dieser Reaktion wird ein $NADH_2^+$ Molekül gebildet. A: Pyruvat-Decarboxylase; B: Lipoamid-Reduktase-Transacetylase; C: Dihydrolipoyl-Dehydrogenase. A-C: Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex.

Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex besteht aus mehrfachen Kopien der drei Enzyme, 5 Co-Enzymen und zwei regulatorischen Proteinen (Kinase und Phosphatase: bei zu hohem ATP-Gehalt kann so die Aktivität des gesamten Komplexes herunter reguliert werden).

Aus beiden Oxidationsprozessen resultieren **Acetyl-CoA** Moleküle, die sehr rasch dem Zitrazyklus zugeführt werden.

Zitronensäurezyklus
Im wesentlichen oxidiert der Zitronensäure-Zyklus (Krebszyklus) die Acylgruppe von Acetyl-CoA und bildet dabei $NADH_2^+$ und $FADH_2^+$ für die Atmungskette. Die beiden C-Atome des Acetyl-CoA Moleküls werden dabei so in den Zyklus eingebracht, daß sie im nächsten Zyklus als CO_2 diesen wieder verlassen. Insgesamt werden pro eingebrachten Acetyl-CoA Molekül drei Moleküle $NADH_2^+$ gebildet. Das resultierende GTP kann in ATP verwandelt werden. Das gebildete $FADH_2^+$ verbleibt als Teil im Succinat-DH-Komplex und überträgt die im $FADH_2^+$ enthaltenen Elektronen direkt auf das **Ubichinon** während der oxidativen Phosphorylierung.



037: Der Zitronensäurezyklus

Oxidative Phosphorylierung

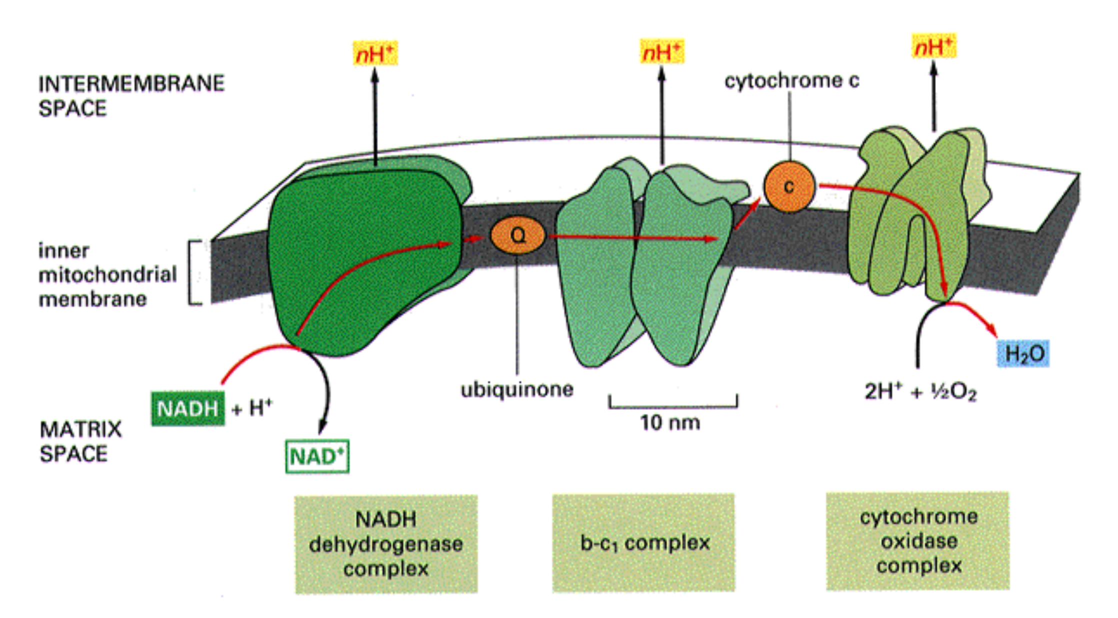
Oxidative Phosphorylierung wird durch den **NADH-DH-Komplex** durchgeführt. Dieser besteht aus drei membrangebundenen Atmungsenzymkomplexen und arbeitet als elektronengetriebene Protonenpumpe. Diese drei Komplexe sind:

Der **NADH-Dehydrogenase-Komplex** ist mit einer Masse von 800 KDa und mehr als 22 Polypeptidketten der größte der drei Atmungsenzymkomplexe. Er nimmt Elektronen vom $NADH_2^+$ auf und gibt sie über ein Flavin und mindestens fünf Eisen-Schwefel-Zentren an Ubichinon weiter, das seine Elektronen auf einen zweiten Atmungsenzymkomplex, den b/c_1-Komplex überträgt.

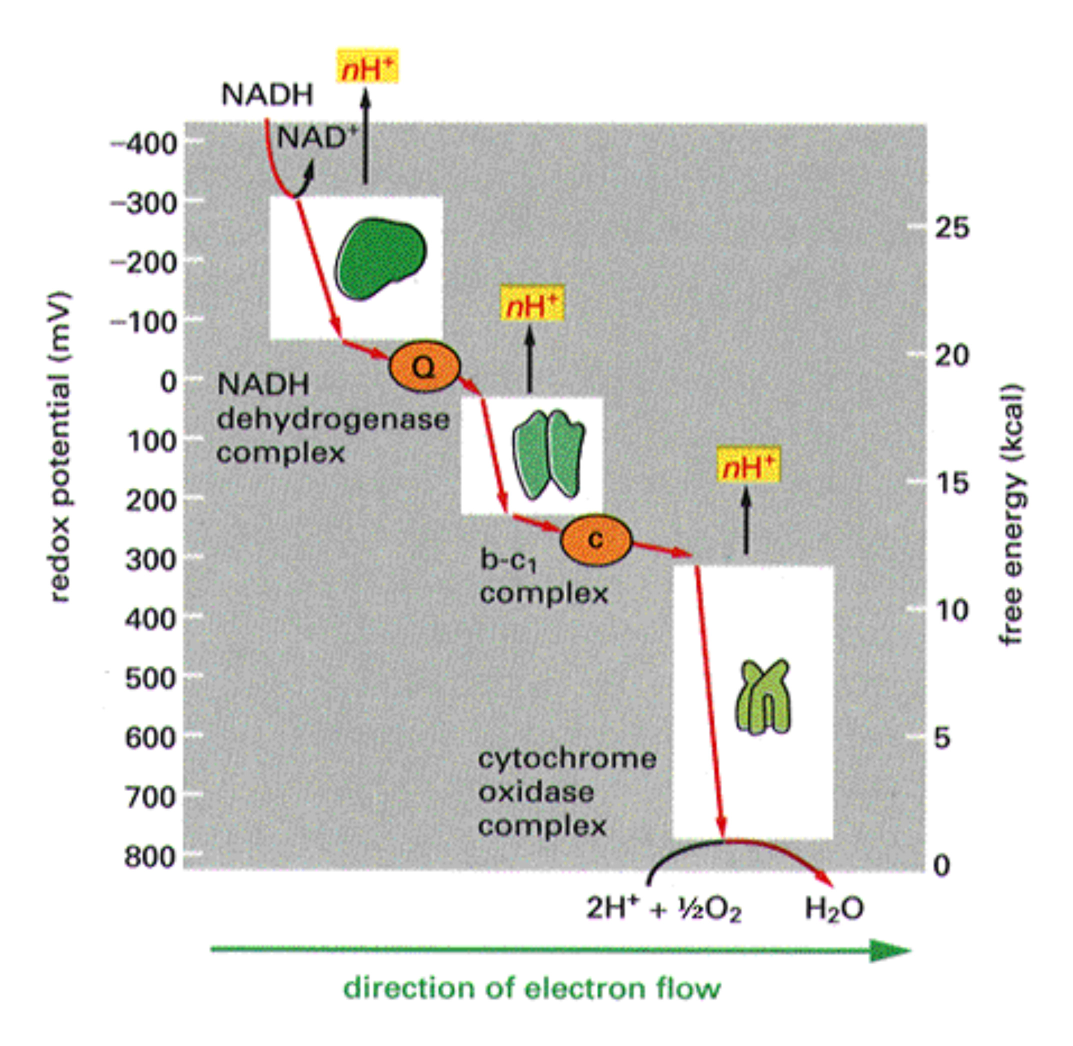
Der **Cytochrom b/c_1-Komplex** enthält mindestens acht verschiedene Polypeptide und arbeitet vermutlich als Dimer von rund 500 KDa. Jedes Monomer enthält drei an Cytochrome gebundene Hämgruppen und ein Eisen-Schwefel-Protein. Der Komplex übernimmt Elektronen vom Ubichinon und gibt sie an Cytochrom c weiter, das sein Elektron auf den Cytochrom-Oxidase-Komplex überträgt.

Der **Cytochrom-Oxidase-Komplex** (Cytochrom a/a3) ist der am besten charakterisierte der drei Atmungsenzymkomplexe. Er kann als Dimer von rund 300 KDa isoliert werden; jedes Monomer besteht aus wenigstens 9 verschiedenen Polypeptidketten, darunter zwei Cytochromen, und zwei Kupferatomen. Der Komplex übernimmt Elektronen vom Cytochrom c und gibt sie an Sauerstoff weiter.

Bemerkung: Cytochrome, Eisen-Schwefel-Zentren und Kupferatome können jeweils nur ein Elektron zur Zeit befördern. Nun gibt aber jedes $NADH_2^+$ zwei Elektronen ab und jedes O_2-Molekül benötigt vier Elektronen zur Bildung von Wasser. Entlang der Atmungskette gibt es verschiedene Elektronen-Sammel- und -Verteilungsstellen, in denen diese Änderungen der Elektronenzahl ausgeglichen werden.

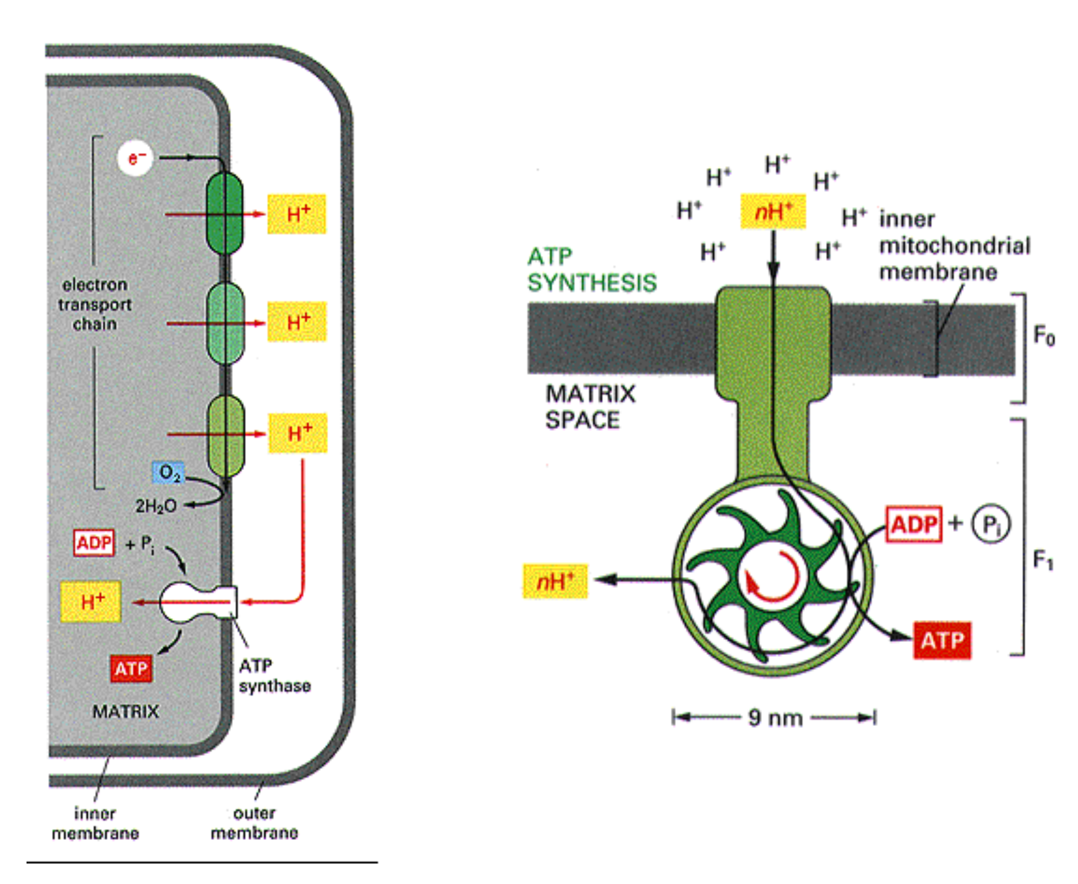


038: Schematische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung an der Innenmembran der Mitochondrien



039: Redoxpotentiale der oxidativen Phosphorylierung

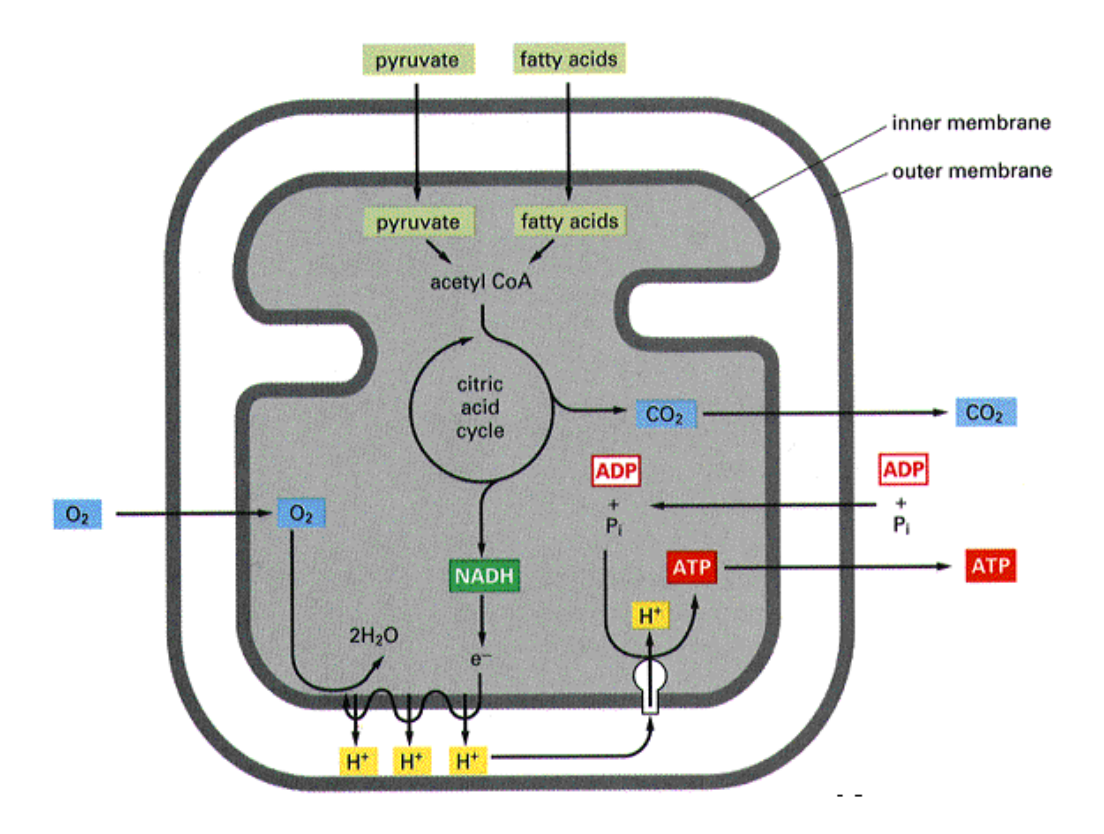
Durch die Arbeit des **NADH-DH-Komplexes** entsteht ein Protonengradient an der inneren Membran des Mitochondriums. Dieser Protonengradient (pH-Gradient) wird dazu benutzt, um an einem weiteren Enzymkomplex ATP aus den beiden Komponenten ADP und P_i herzustellen. Dieser Enzymkomplex heißt **ATP-Synthase**.



040: Schematische Darstellung des Protonengradienten und der ATP Synthase

Im nächsten Schema sind die bisher besprochenen Einzelreaktionen nochmal zusammengefasst und übersichtlich dargestellt. Mitochondrien sind kleine Maschinen, die aus einer einzigen spezifischen C-Quelle (Acetyl-CoA) und Sauerstoff (O_2) letzendlich CO_2 und ATP herstellen können. Aus **drei Protonen** kann der Enzymkomplex ATP-Synthase **ein Molekül ATP** aus den beiden Substraten ADP und Pi herstellen (ein Proton erzeugt einen ΔG-Wert von 19.3 KJ/mol; 3 Protonen ca. 58 KJ/mol). Aus jedem Acetyl-CoA Molekül, das in den Zitronensäurezyklus eingeht, werden **ca**. 10 ATP Moleküle gebildet. Aus einem Palmitinsäuremolekül (16 C-Atome) **ca.** 84 Moleküle ATP.

Diese Werte sind allerdings nur dann richtig, wenn man davon ausgeht, daß der Protonengradient an der inneren Mitochondrienmembran ausschließlich zur Bildung von ATP genutzt wird. Tatsächlich finden aber auch noch weitere Nebenreaktionen für andere biochemische Prozesse statt, sodaß alle diese Angaben nur Näherungswerte darstellen.

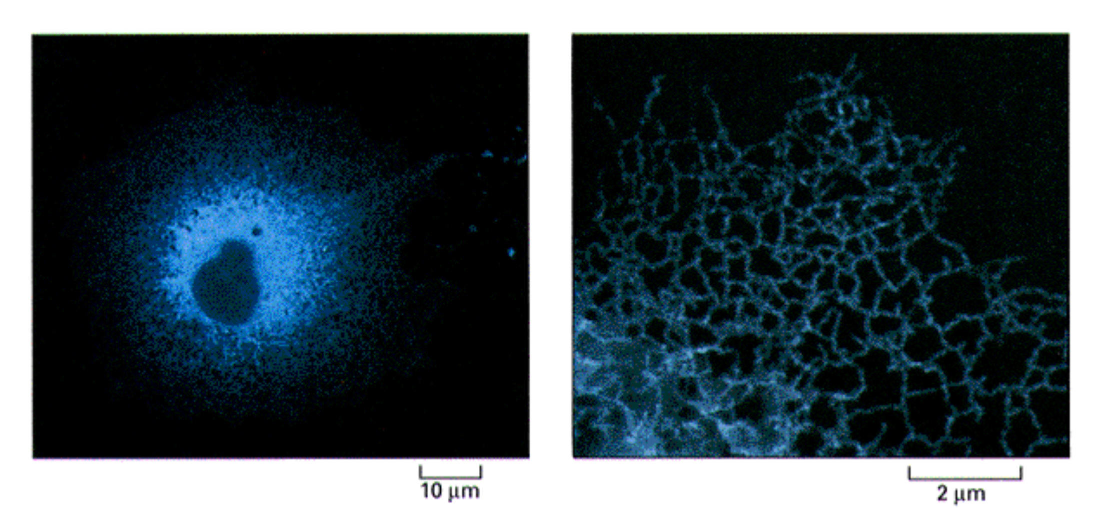


041: Darstellung der Reaktionen, um in den Mitochondrien Energie herzustellen

DES ENDOPLAMATISCHEN RETICULUMS

Alle eukaryontischen Zellen besitzen ein Endoplasmatisches Reticulum (ER). Seine Membran macht im Normalfall mehr als die Hälfte der gesamten Membranmenge einer Zelle aus. Die ER-Membran bildet ein engmaschiges Netz aus sich verzweigenden Röhren, das sich durch das ganze Cytoplasma erstreckt. Die Röhren sind untereinander verbunden, so daß die ER-Membran eine zusammenhängende Fläche bildet, die einen einzigen Innenraum umschließt. Diesen äußerst gewundenen Raum, der etwa 10% des gesamten Zellvolumens in Anspruch nimmt, nennt man das ER-Lumen. Die ER-Membran trennt das ER-Lumen vom Cytoplasma und sorgt dafür, daß ein selektiver Transport ausgesuchter Proteine zwischen diesen beiden Kompartimenten stattfinden kann.

Das ER spielt eine zentrale Rolle bei der **Biosynthese** von Lipiden und Proteinen. Die Synthese aller Transmembranproteine und Lipide für die meisten Organellen der Zelle einschließlich des ER selbst, des Golgi-Apparates, der Lysosomen, der Endosomen, der sekretorischen Vesikel, der Plasmamembran, der Mitochondrien und der Peroxisomen beginnt an der ER-Membran. Darüber hinaus werden alle neu-synthetisierten Proteine, die letztendlich die aus der Zelle ausgeschleust werden sollen - ebenso wie die Proteine, die in das Lumen des ER, des Golgi-Apparates oder der Lysosomen gehören - zunächst in das ER-Lumen transportiert.



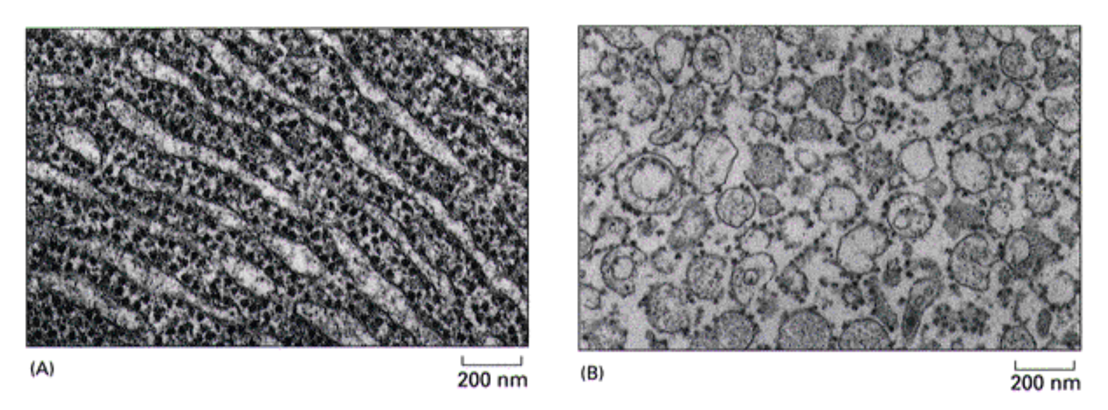
042: Immunohistologischer Nachweis eines ER Proteins durch spezifischen Antikörper

Das ER nimmt spezifische Proteine bereits während der Synthese aus dem Cytoplasma auf. Diese Proteine können in zwei Gruppen eingeteilt werden: (1) **Transmembranproteine**, die die ER-Membran nur teilweise durchqueren und in sie eingebettet werden, und (2) **lösliche Proteine**, die vollständig durch die ER-Membran hindurch transportiert werden und im Lumen des ER freigesetzt werden. Einige Transmembranproteine verbleiben im ER; viele sind jedoch am Aufbau der Plasmamembran oder von Membranen anderer Organellen beteiligt; lösliche Proteine werden aus der Zelle exportiert oder sind im Lumen der Organelle zu finden. Ungeachtet ihres späteren Schicksals werden alle Proteine immer über den gleichen Typ von **Signalpeptiden** zur ER-Membran dirigiert und über den selben Mechanismus durch die ER-Membran transportiert.

In Säugerzellen beginnt der Transport von Proteinen ins ER bereits während der Synthese der Polypeptidkette (Translation), er verläuft also **co-translational**. Darin unterscheidet sich dieser Prozeß vom Transport in Mitochondrien, Chloroplasten, Zellkern und Peroxisomen, der post-translational stattfindet und andere Typen von **Signalpeptiden** erfordert. Da sich ein Ende des Proteins bereits im ER befindet, während der Rest erst noch synthetisiert wird, findet nie eine Freisetzung und Faltung im Cytoplasma statt. Daher werden - im Gegensatz zum posttranslationalen Import in Mitochondrien und Chloroplasten - für den co-translationalen Import in das ER im allgemeinen keine **cytoplasmatischen Chaperone** (Heatshock-Proteine) benötigt, um das Protein in einem entfalteten Zustand zu halten. Das Ribosom, das an der Synthese des Proteins beteiligt ist, bindet unmittelbar an die ER-Membran. Membran-gebundene Ribosomen bedecken die Oberfläche des ER, das in diesen besonderen Bereichen als **rauhes Endoplasmatisches Reticulum** bezeichnet wird

Im Cytoplasma lassen sich also die Ribosomen in zwei räumlich voneinander getrennte Populationen einteilen. Die **Membran-gebundenen Ribosomen** sind an die Cytoplasmaseite der ER-Membran angeheftet und sorgen dort für die Synthese der Proteine, die sofort ins ER weitergeleitet werden. Die **freien Ribosomen** sind nicht an Membranen gebunden; sie sind der Ort der Synthese aller anderen Proteine, die im Zellkern kodiert sind. Membrangebundene und freie Ribosomen

sind bezüglich ihrer Struktur und Funktion identisch und unterscheiden sich nur in den Proteinen, welche sie zu einem bestimmten Zeitpunkt synthetisieren. Wenn ein Ribosom zufällig an der Synthese eines Proteins mit einem **ER-Signalpeptid** beteiligt ist, dirigiert dieses Signal das Ribosom zur ER-Membran. Da viele Ribosomen an ein einzelnes mRNA-Molekül binden können, entsteht gewöhnlich ein **Polyribosom**, das über die Signalpeptide mehrerer wachsenden Polypeptidketten an die Membran gebunden ist. Die einzelnen Ribosomen, die an ein solches mRNA-Molekül gebunden sind, können in das Cytoplasma zurückkehren, wenn die Translation der mRNA in der Nähe des 3'-Endes des mRNA-Moleküls beendet ist. Die mRNA selbst bleibt meist über immer neue membrangebundene Ribosomen mit der ER-Membran verbunden. Wenn dagegen ein mRNA-Molekül ein Protein kodiert, das kein ER-Signalpeptid besitzt, bleibt das Polyribosom frei im Cytoplasma und sein Proteinprodukt wird dort freigesetzt. Es binden also nur solche mRNA-Moleküle an die rauhe ER-Membran, die ein Protein mit einem ER-Signalpeptid kodieren; die mRNAs für alle anderen Proteine bleiben frei im Cytoplasma. Die einzelnen Ribosomen pendeln wahrscheinlich zwischen diesen beiden getrennten Populationen von mRNA-Molekülen hin und her.



043: Vergleich von rauhem und glatten ER

ER-Bereiche, an die keine Ribosomen gebunden sind, bezeichnet man als **glattes Endoplasmatisches Reticulum** oder **glattes ER**. In den meisten Zellen gibt es wenig oder gar kein echtes glattes ER; stattdessen ist ein kleiner Bereich des ER teilweise glatt und teilweise rauh. Solche Abschnitte nennt man **Übergangs-ER** oder **Übergangsele-**

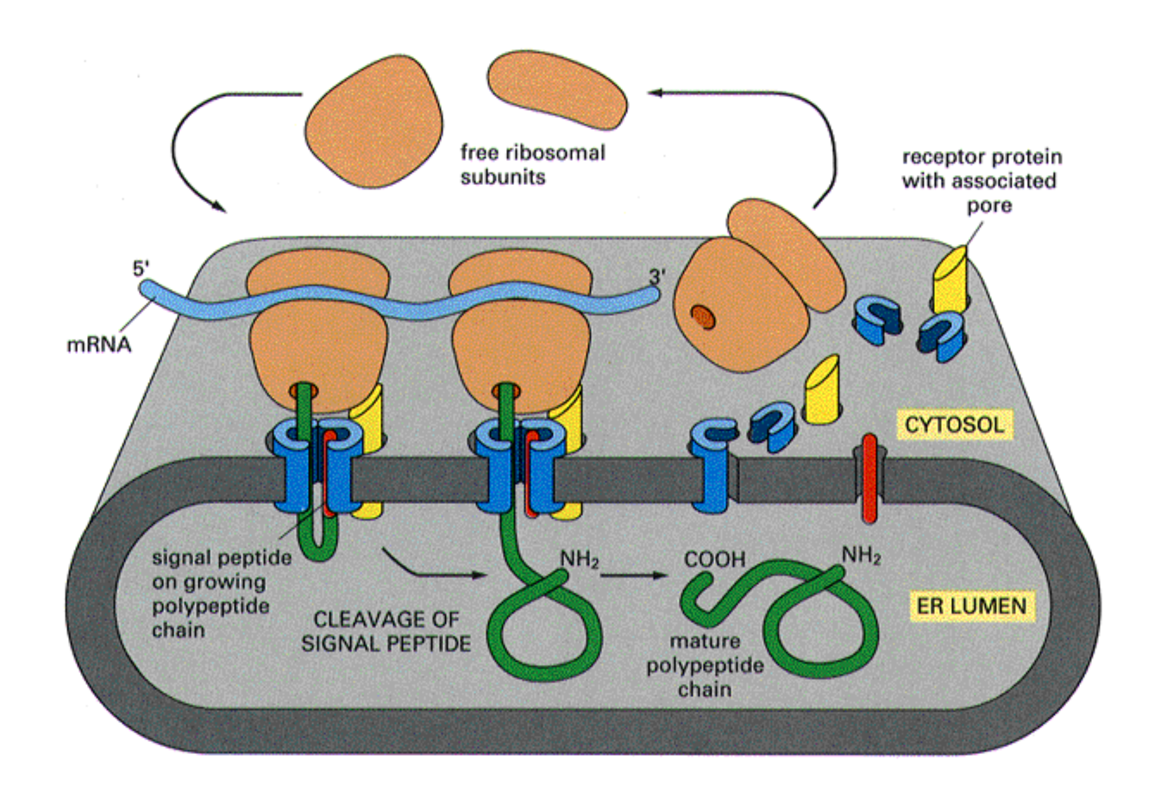
mente; dort schnüren sich die Transportvesikel ab, die neusynthetisierte Proteine und Lipide zum Golgi-Apparat transportieren (siehe Seite 69). In bestimmten spezialisierten Zellen kommt jedoch das glatte ER vermehrt vor und erfüllt dort zusätzliche Funktionen. Das glatte ER überwiegt vor allem in Zellen, die sich auf den Lipidstoffwechsel spezialisiert haben. So z.B. besitzen Zellen, die aus Cholesterin bestimmte Steroidhormone herstellen, ein ausgedehntes glattes ER-Kompartiment, um diejenigen Enzyme unterzubringen, die Cholesterol produzieren und zu Hormonen weiterverarbeiten.

Ein weiteres Beispiel ist der Hauptzelltyp der Leber, der **Hepatozyt**. Die Hepatozyten sind die wichtigsten Produktionsstätten für Lipoproteinpartikel, die aus der Zelle ausgeschieden werden sollen. Diese Partikel transportieren Lipide über die Blutbahn zu anderen Stellen des Körpers. Die Enzyme, die die Lipidanteile der Lipoproteine synthetisieren, liegen in der Membran des glatten ER; andere, ebenfalls dort lokalisierte Enzyme, katalysieren eine Reihe von Reaktionen, mit denen **fettlösliche Arzneimittel** und **gefährliche Stoffwechselprodukte** beseitigt werden. Eine dieser Entgiftungsreaktionen, die von Enzymen der **Cytochrom P450-Familie** katalysiert wird, ist besonders gut untersucht; wasserunlösliche Arzneimittel oder Stoffwechselprodukte, die in der Membran zu toxischen Mengen angereichert würden, werden **in wasserlösliche Formen überführt**, so daß sie die Zelle verlassen können, um über den Urin ausgeschieden zu werden. Da das rauhe ER alleine die notwendigen Enzyme nicht in ausreichender Menge beherbergen kann, besteht der Großteil der Membranen in Hepatozyten aus glattem ER.

Wenn bestimmte Verbindungen, z.B. der Arzneistoff **Phenobarbital**, in großen Mengen in den Kreislauf gelangen, werden Entgiftungsenzyme in ungewöhnlich großen Mengen in der Leber gebildet und das glatte ER verdoppelt innerhalb weniger Tage seine Oberfläche. Ist der Arzneistoff beseitigt, scheinen die überschüssigen ER-Membranen spezifisch abgebaut zu werden, und zwar über einen lysosomalen Vorgang, an dem sogenannte **Autophagosomen** beteiligt sind. Wie diese drastischen Veränderungen reguliert werden, ist noch nicht bekannt.

Eine weitere **Funktion des ER** der meisten eukaryontischen Zellen ist es, **Ca^{2+} aus dem Cytoplasma** aufzunehmen. Die Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem ER in das Cytoplasma und seine anschließende Wiederaufnahme reguliert viele schnelle intrazelluläre Reaktionen, die auf extrazelluläre Reize folgen, wie sie später im Kapitel "**Kommunikation**" noch ausführlicher besprochen wird. Das Speichern von Ca^{2+} wird durch eine hohe Konzentration an **Ca^{2+} bindenden Proteinen** im ER ermöglicht. In einigen Zellen, vielleicht sogar in den meisten, sind bestimmte Bereiche des ER auf die Speicherung von Ca^{2+} spezialisiert. Zum Beispiel besitzen Muskelzellen ein ausgedehntes spezialisiertes glattes ER, das als **Sarkoplasmatisches Reticulum** bezeichnet wird, und das das Ca^{2+} über eine Ca^{2+}-ATPase aus dem Cytoplasma in das ER einschleust; die Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem Sarkoplasmatischen Reticulum und die anschließende Wiederaufnahme vermitteln das Zusammenziehen und die Entspannung der Myofibrillen während der Muskelkontraktion.

Die ersten **Signalpeptide** (und den mit ihnen zusammenhängenden Protein-Transportweg) entdeckte man Anfang der 70er Jahre bei Proteinen, die zunächst die ER Membran passieren, bevor sie aus der Zelle ausgeschleust werden. Die Beobachtungen, die zu dieser Entdeckung führten, wurden in Experimenten gemacht, bei denen die mRNA für ein solches sekretorisches Protein an freien Ribosomen *in vitro* translatiert wurde. Enthielt dieses zellfreie System keine Mikrosomen, so war das synthetisierte Protein etwas größer als das Protein, das normalerweise aus Zellen ausgeschleust wird. Es enthielt zusätzlich an seinem Amino-Ende ein **Leitpeptid**. Waren dagegen rauhe Mikrosomen vorhanden, dann hatte das neusynthetisierte Protein die richtige Größe. Diese Ergebnisse erklärte man durch die **Signalhypothese**, die besagt, daß das Leitpeptid als Signal für den Transport des Proteins zur ER-Membran zuständig ist und noch vor Ende der Polypeptidsynthese durch eine spezielle, in der Membran lokalisierten Protease abgespalten wird. Für diese bahnbrechende Beobachtung wurde im Jahr 2000 der Nobelpreis an den ehemaligen deutschen Wissenschaftler Dr. G. Blobel vergeben.

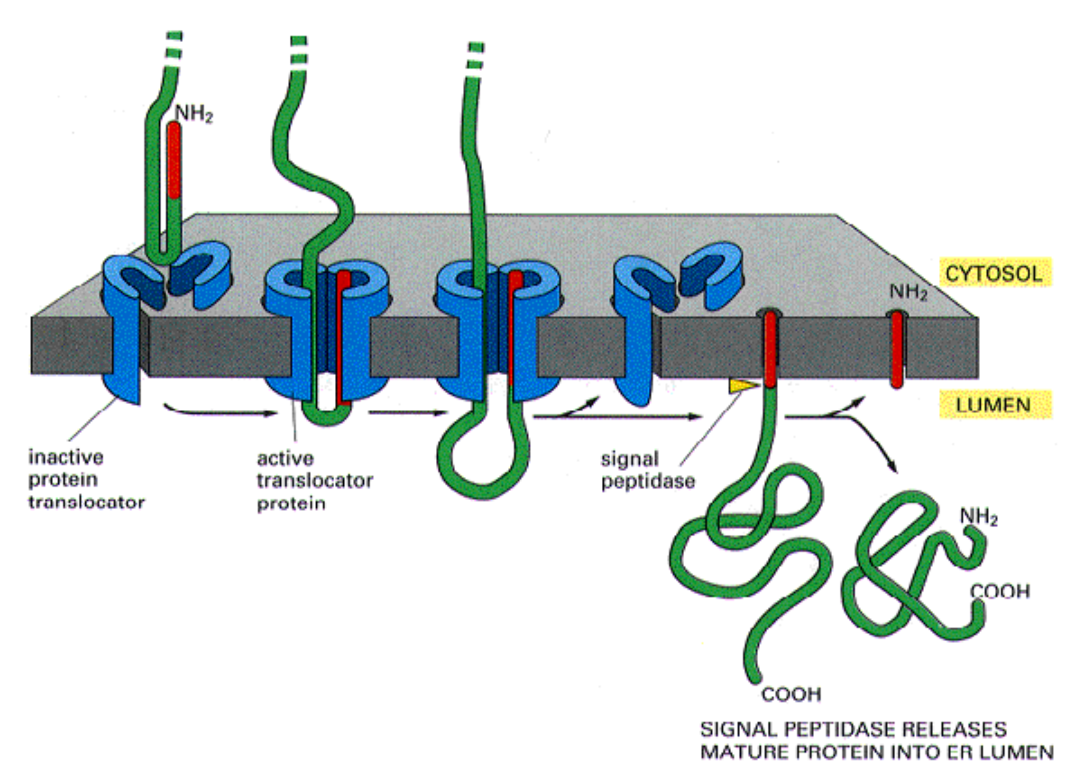


044: Import ins ER: Blobel's Hypothese des Signalpeptids

Die **Signalhypothese** wurde in genetischen und biochemischen Untersuchungen eingehend überprüft. Wie sich dabei herausstellte, gilt sie sowohl für **pflanzliche** als auch für **tierische Systeme** und ist darüber hinaus auch für den Proteintransport durch die Plasmamembranen der Prokaryonten und auch für den Transport durch Mitochondrien-, Chloroplasten- und Peroxisomenmembran gültig.

Nicht nur exportierbare Proteine enthalten ein Leitpeptid; auch alle anderen Vorläufermoleküle der Proteine, die im ER hergestellt werden, seien es lösliche Proteine oder Membranproteine, werden durch **Signalpeptide** zur ER Membran geleitet. Die Signalsequenz-spezifische Eigenschaft, den Transport von Vorläuferproteinen zur ER-Membran zu gewährleisten, konnte experimentell direkt nachgewiesen werden. Mit Hilfe **gentechnischer Methoden** koppelte man eine ER-spezifische Leitsequenz an cytosplasmatische Proteine; durch Transportstudien zeigte sich, daß die so entstandenen Fusionsproteine ins ER gelangen.

Die **Signalpeptide** von Vorläuferproteinen der Mitochondrien oder Chloroplasten werden **abgespalten**, sobald die jeweilige Membran durchquert ist. Auf ähnliche Weise werden im Lumen des ER die aminoterminalen Signalpeptide von einer **Signalpeptidase** abgespalten. Die Information, die in der Signalsequenz vorliegt, reicht jedoch alleine nicht aus, um diesen Prozeß auszulösen. Um das Protein spalten zu können, benötigt die Peptidase eine zusätzliche Erkennungssequenz, die nach dem Signalpeptid folgt. Später werden wir noch sehen, daß Signalpeptide, die sich nicht am aminoterminalen Ende, sondern innerhalb der Polypeptidkette befinden, diese zusätzliche Erkennungsstelle nicht aufweisen und auch nie gespalten werden; statt dessen dienen sie dazu, Transmembranproteine in der Lipid-Doppelschicht zu verankern, nachdem der Translokationsprozeß abgeschlossen ist.



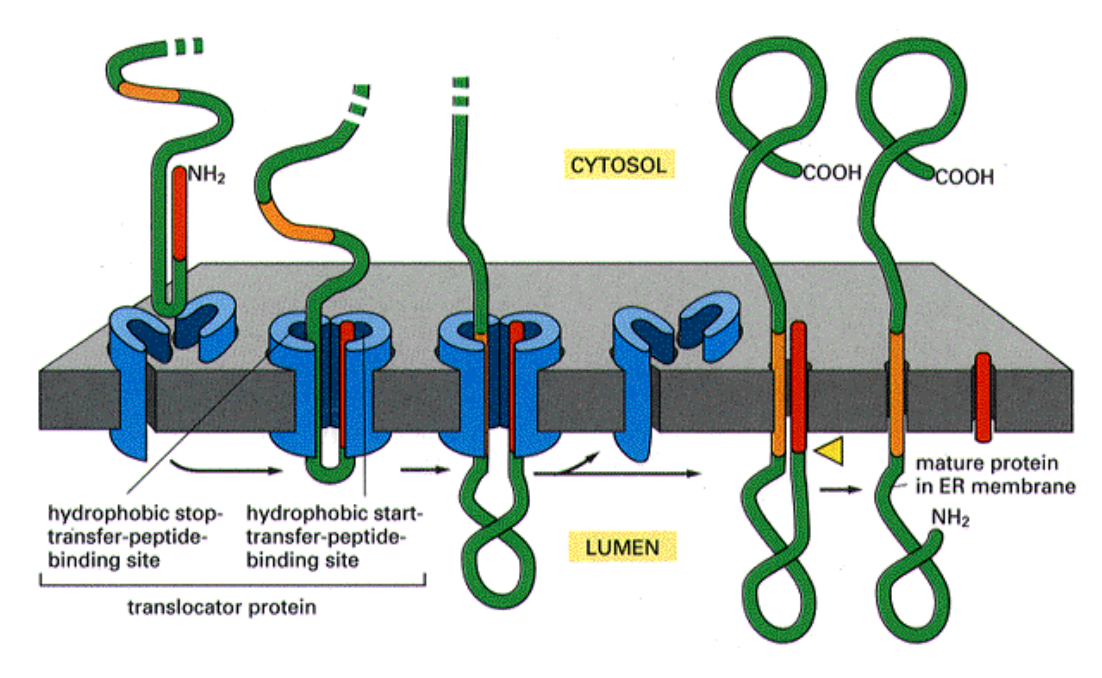
045: N-terminale Signalpeptide werden nach Durchtritt durch die ER Membran abgespalten

Ein aminoterminales ER-Signalpeptid übt zwei Funktionen aus: zum einen leitet es das Protein zur ER-Membran, zum anderen dient es als **Start-Transfer-Signal**, das im Translokationsapparat verbleibt, während der Rest der Polypeptidkette in Form einer großen Schleife konti-

nuierlich durch die Membran durchgezogen wird. Hat das carboxyterminale Ende dann das Lumen erreicht, löst sich das Signalpeptid von der Translokationspore ab, wird von der Peptidase abgeschnitten und von anderen ER-Proteasen rasch zu Aminosäuren abgebaut. Das Protein wird dadurch im Lumen des ER freigesetzt.

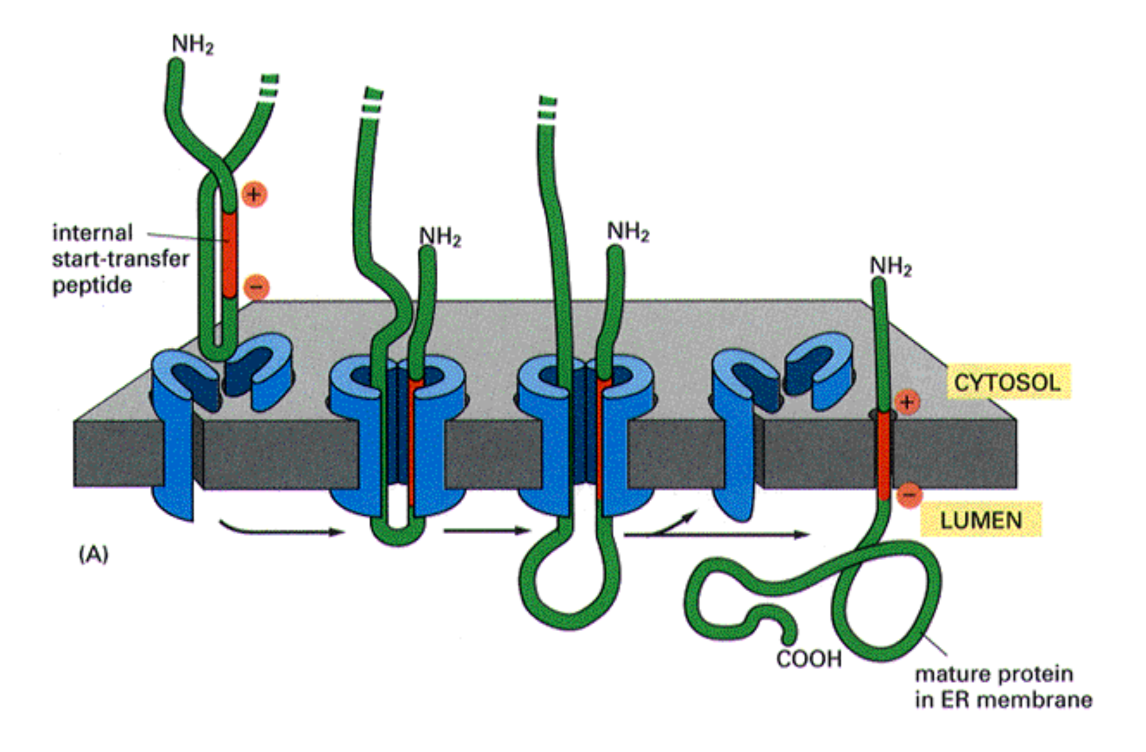
Für Proteine, die in der Membran verbleiben sollen, ist der Translokationsprozeß komplizierter als für lösliche Proteine, da nur ein Teil der Polypeptidkette durch die Lipid-Doppelschicht transloziert wird. Im folgenden werden **drei Möglichkeiten** beschrieben, wie Proteine mit einer Transmembransequenz in die ER-Membran inseriert werden.

Im einfachsten Fall vermittelt eine **aminoterminale Signalpeptid-Sequenz** das Signal für die Translokation, aber eine zusätzliche hydrophobe Sequenz im Inneren der Polypeptidkette stoppt den Translokationsprozeß. Dieses Stop-Transfer-Peptid verankert das Protein in der Membran, nachdem das ER Signalpeptid (oder Start-Transfer-Peptid) vom Translokator freigegeben und anschließend abgespalten wurde. Das Stop-Transfer-Peptid bildet eine alpha-helikale Struktur, die die Membran einmal durchdringt, wobei der Aminoterminus des Proteins auf der luminalen Seite, der Carboxyterminus auf der cytoplasmatischen Seite der Membran zu liegen kommt.



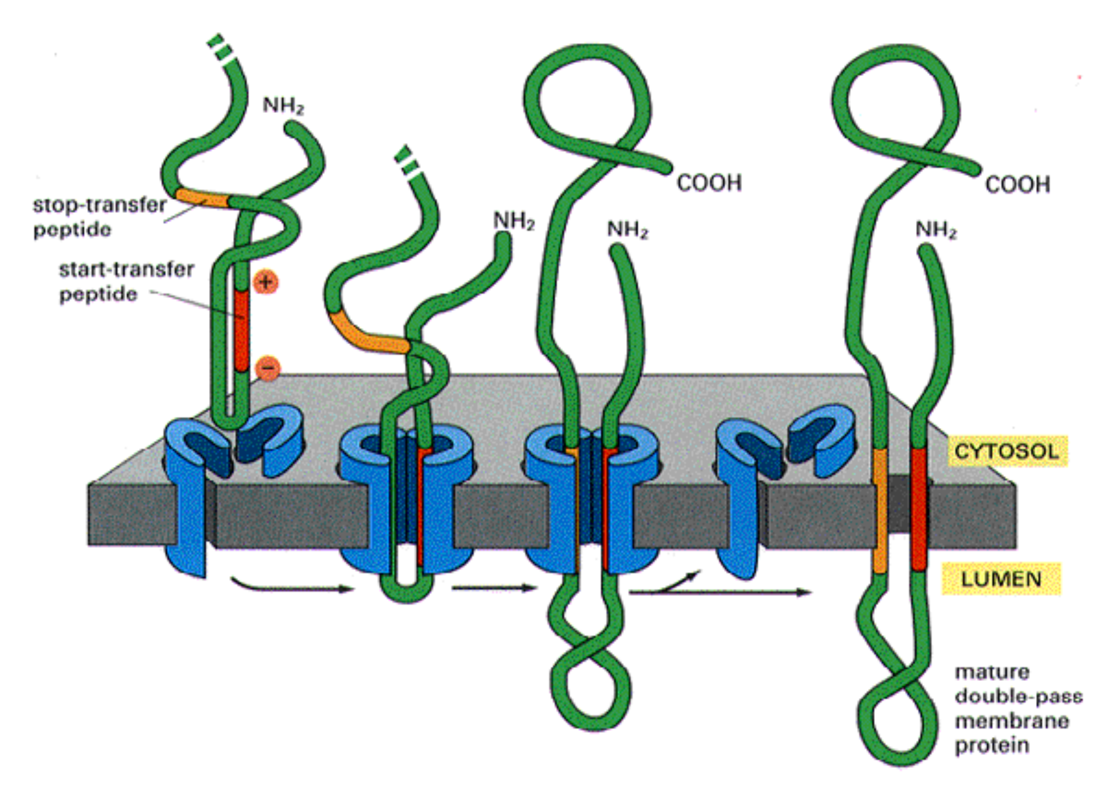
046: Proteine mit einer TMD werden in die Membran des ER inseriert

In den beiden anderen Fällen liegt das Signalpeptid nicht am Aminoterminus des Proteins, sondern im **Inneren der Polypeptidkette**. Wie eine aminoterminale ER-Signalsequenz wird auch eine interne Signalsequenz, die die wachsende (naszierende) Polypeptidkette mit dem Ribosom zur ER-Membran dirigiert, erkannt. Somit sind auch interne Signalsequenzen als Start-Transfer-Signale an der Initiation der Translokation des Proteins beteiligt. Nach Freigabe durch den Translokator verbleibt das Start-Transfer-Peptid als einzelnes alpha-helikales Element in der Lipid-Doppelschicht. Dieser Mechanismus läßt für die Signalsequenz **zwei Orientierungen** zu, wodurch auch die endgültige Orientierung des reifen Proteins festgelegt ist. Im einen Fall befindet sich der Carboxyterminus auf der luminalen Seite der ER-Membran, im anderen Fall ist es der Aminoterminus. Die Orientierung des Start-Transfer-Peptids hängt von der Ladung der Aminosäuren in der Nähe der Signalsequenz ab.



047: Insertion eines Polypeptids in die ER-Membran: ist die Ladung des internen Start-Transfer-Peptids umgekehrt, so erscheint der Carboxyterminus im Cytoplasma

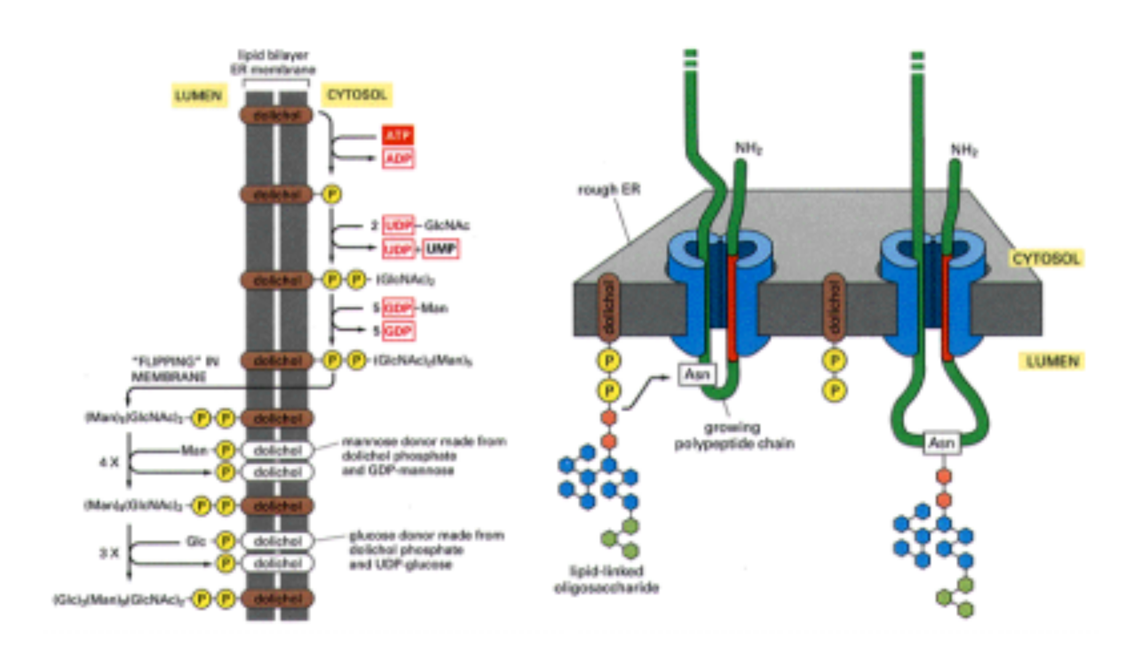
In Membranproteinen mit mehreren Transmembrandomänen durchspannt die Polypeptidkette mehrfach die Lipid-Doppelschicht. Man nimmt an, daß in diesen Proteinen ein **internes Signalpeptid** als Start-Transfer-Signal dient, wodurch die Translokation eingeleitet wird, die solange fortschreitet, bis ein **Stop-Transfer-Signal** erreicht wird. In zweifach membrandurchspannenden Transmembranproteinen wird das Polypeptid an diesem Punkt freigegeben. In komplexeren Proteinen mit mehreren membrandurchdringenden Domänen wird durch ein weiteres Start-Transfer-Peptid in der Polypeptidkette wieder eine Translokation initiiert, bis diese beim nächsten Stop-Transfer-Peptid wieder abgebrochen wird. Dieser Prozeß kann mehrfach stattfinden.



048: Insertion von Polypeptiden mit mehreren Transmembrandomänen in die ER-Membran

Ob eine bestimmte Signalsequenz als Start-Transfer- oder Stop-Transfer-Peptid fungiert, hängt von seiner Position in der Polypeptidkette ab; wenn man die Lage einer hydrophoben Signalsequenz mit Hilfe gentechnologischer Methoden in der Polypeptidkette verändert, ändert sich auch seine Funktion: die Unterscheidung zwischen Start-Transfer- und Stop-Transfer-Peptid hängt von seiner relativen Lage ab.

Eine der wichtigsten biosynthetischen Aufgaben des ER ist die kovalente Anheftung von Zuckern an Proteine. Die meisten Proteine, die sich im ER-Lumen ansammeln und dann zum Golgi-Apparat, zu den Lysosomen, zur Plasmamembran oder in die Umgebung der Zelle transportiert werden, sind **Glykoproteine**. Dagegen gibt es im Cytoplasma nur wenige glykosylierte Proteine, die außerdem auch eine viel einfachere Zuckerstruktur tragen: hier ist eine einzige N-Acetylglucosamin-Gruppe an einen Serin- oder Threoninrest des Proteins geknüpft.



049: Der Glykosylierungs-Pathway im ER: Kopplung eines Oligosaccharids an Asparagin-Seitenketten (rot: N-Acetylglucosamin; blau: Mannose; grün: Glucose)

Die meisten der am rauhen ER synthetisierten Proteine werden über die Anheftung eines **N-gekoppelten Oligosaccharids** glykosyliert. Ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Proteinglykosylierung war die Entdeckung, daß ein vorgefertigter Oligosaccharidkomplex mit insgesamt 14 Zuckerresten (bestehend aus N-Acetylglucosamin, Mannose und Glucose) *en bloc* auf ein Protein übertragen wird. Da dieses Oligosaccharid immer an die NH_2-Gruppe der Seitenkette eines **Asparaginrests** gebunden ist, bezeichnet man die Glykosylierung als N- oder Asparagin-gekoppelt. Die Übertragung wird von einem membrangebundenen Enzym, der Oligosaccharyl-Transferase, katalysiert, dessen aktives Zentrum sich an der dem Lumen zugewandten Seite der ER-

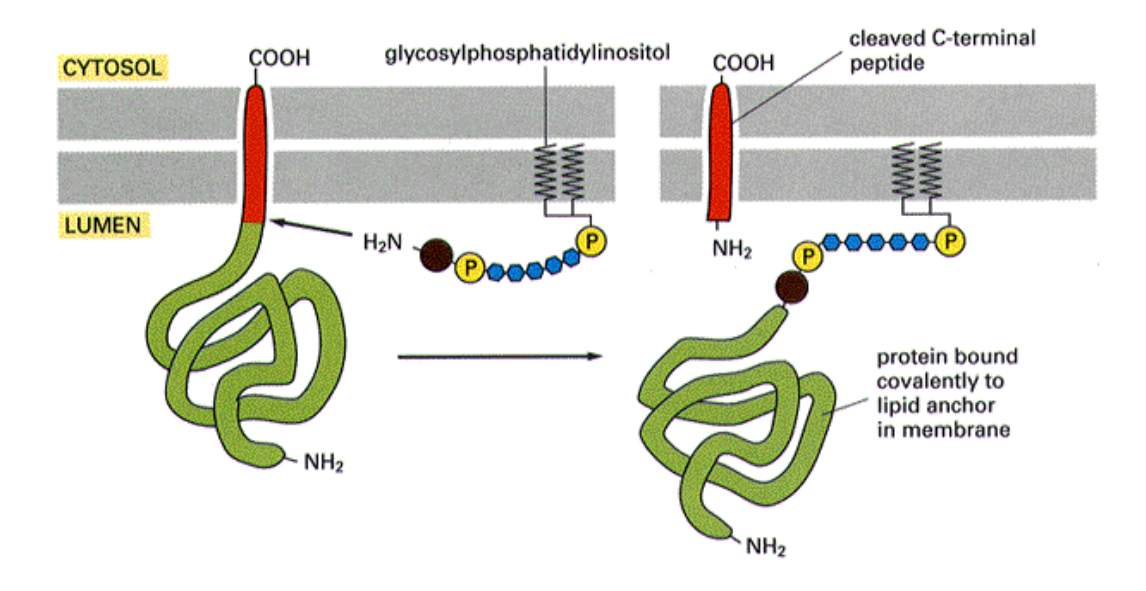
Membran befindet; das erklärt auch, warum cytoplasmatische Proteine nicht auf diese Weise glykosyliert werden. Das Vorläufer-Oligosaccharid wird in der ER-Membran von einem besonderen Lipidmolekül, dem Dolichol, festgehalten, und wird von da in einer einzigen Enzymreaktion auf den Asparaginrest des Proteins übertragen. Dies geschieht nahezu im gleichen Moment, in dem dieser Asparaginrest bei der Translokation der Polypeptidkette im ER-Lumen auftaucht. Da die meisten Proteine noch während ihrer Synthese in das ER transportiert werden, erfolgt auch die Anheftung der Oligosaccharide fast immer cotranslational.

Die Verschiedenartigkeit der N-gekoppelten Oligosaccharidstrukturen kommt ausschließlich durch umfangreiche Modifikationen der beschriebenen Vorläuferstruktur zustande. Noch im ER werden von den Oligosacchariden der meisten Glykoproteine drei Glucosereste und eine Mannosegruppe schnell wieder entfernt. Dieses „Zurechtschneiden" der Oligosaccharide geht im Golgi-Apparat weiter (siehe Seite 71).

Unter den Oligosacchariden, die man an Glykoproteinen findet, kommen die N-gekoppelten weitaus am häufigsten vor. Seltener sind Oligosaccharide über die Hydroxy-Gruppe von Serin-, Threonin- oder Hydroxylysin-Seitenketten mit dem Protein verbunden. Solche O-gekoppelten Oligosaccharide entstehen im Golgi-Apparat auf Reaktionswegen, die noch nicht vollständig geklärt sind.

Wie bereits besprochen (Seite 23/24), katalysieren einige Cytoplasmatische Enzyme die kovalente Bindung einer einzigen Fettsäurekette oder eines Prenylrestes an ganz bestimmte Proteine, um deren Einbindung in Zellmembranen zu ermöglichen. Im rauhen ER gibt es Enzyme, die einen ähnlichen Prozess steuern: das carboxyterminale Ende einiger Proteine, die zur Plasmamembran gehören, wird kovalent mit dem Zuckeranteil eines Glykolipids verknüpft. Diese Bindung erfolgt über einen Mechanismus im ER der auf der nächsten Abbildung dargestellt ist; dabei wird ein **Glykosylphosphatidylinositol-**(GPI)-Anker, der zwei Fettsäuren enthält, an das Protein gekoppelt. Gleichzeitig wird der Transmembranteil des Proteins abgespalten. Man findet eine zunehmende Zahl von Plasmamembranproteinen, die diese Modifika-

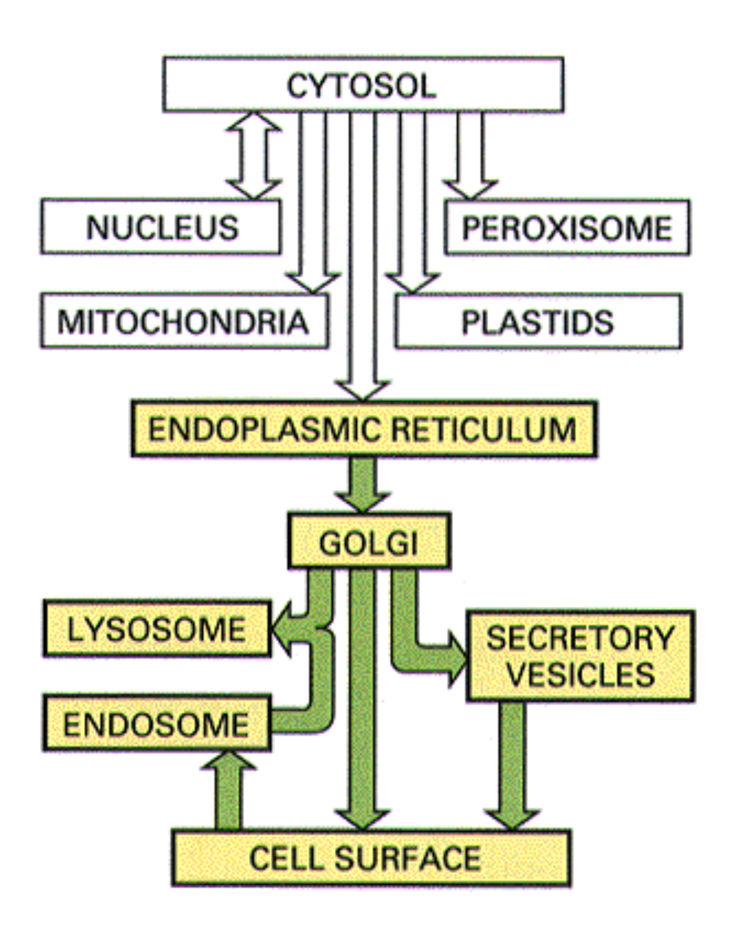
tion trägt. Da sie an der Außenseite der Plasmamembran nur über ihren GPI-Anker befestigt sind, könnten sie im Prinzip als lösliche Proteine freigesetzt werden, wenn eine spezifische Phospholipase in der Plasmamembran auf ein Signal hin aktiviert wird. Parasiten der Trypanosomenfamilie benutzen diesen Mechanismus, um ihren Mantel aus GPI-verankerten Oberflächenproteinen bei einem Angriff durch das Immunsystem abzuwerfen.



050: GPI-Verankerung erfolgt durch enzymatisch katalysierte Umlagerung

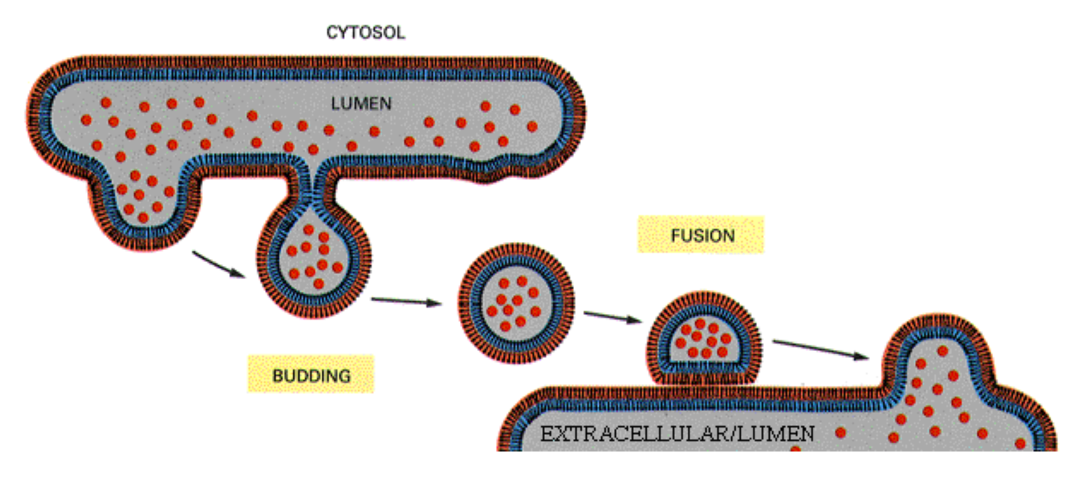
DES GOLGI-APPARATS

Eukaryontische Zellen haben ein ausgeklügeltes inneres Membransystem entwickelt. So können sie in einem als **Endozytose** bezeichneten Vorgang Makromoleküle aufnehmen und den Verdauungsenzymen zuführen, die intrazellulär in den **Lysosomen** gespeichert werden. Als Folge davon werden die in den Verdauungsreaktionen entstehenden **Metabolite** gleich von den Lysosomen ins **Cytoplasma** abgegeben. Das innere Membransystem ermöglicht nicht nur den geordneten Abbau von Makromolekülen über den Endozytose-Weg, sondern Eukaryontenzellen können mit seiner Hilfe auch den Ausstoß neu synthetisierter Proteine und Kohlenhydrate in die Umgebung regulieren. Jedes Molekül, das auf diesen biosynthetischen Ausscheidungsweg gelangt, passiert eine Reihe von Kompartimenten; die Zelle kann es daher in einer Folge kontrollierter Schritte modifizieren, es bis zum Gebrauch lagern und dann in einem Exozytose genannten Vorgang an eine spezifische Domäne der Zelloberfläche befördern.



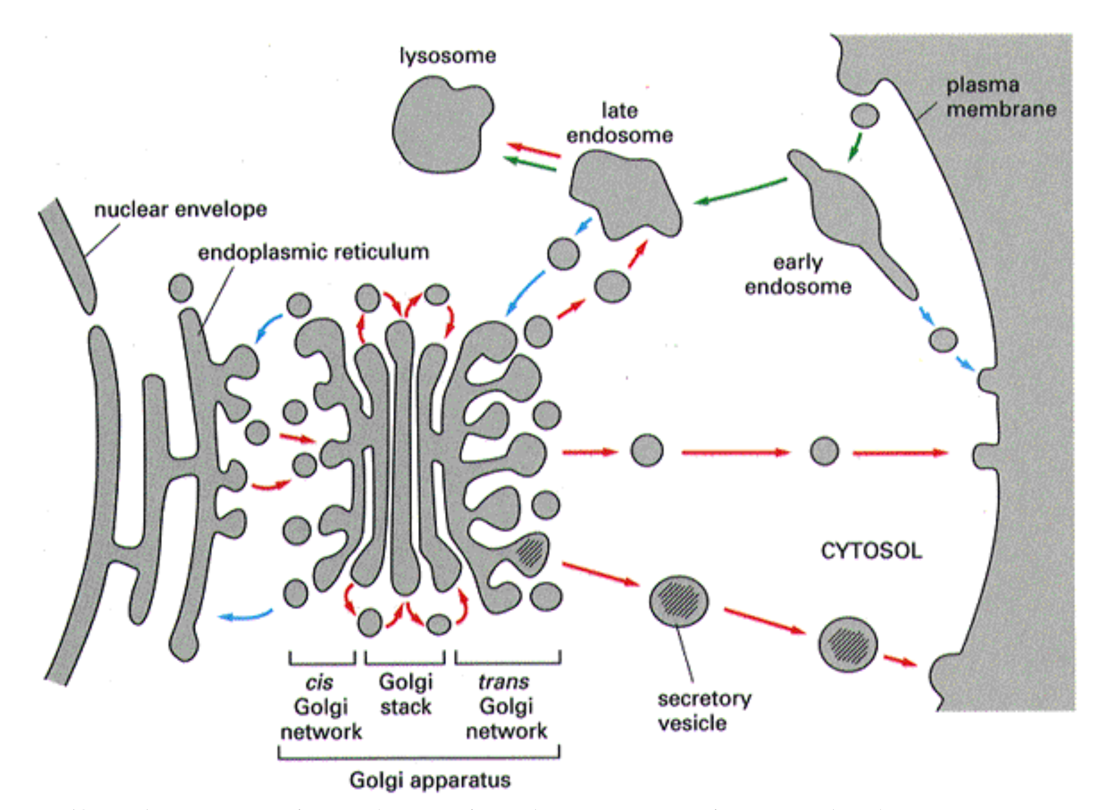
051: Grüne Pfeile markieren die Transportvorgänge vom oder zum Golgi-Apparat

Das Lumen eines jeden Kompartiments entlang der biosynthetischen Ausscheidungswege und des Endozytose-Weges entsprechen topologisch dem Zelläußeren. Die Kompartimente stehen miteinander ständig in Verbindung, zum Teil sorgen hierfür zahlreiche Transportvesikel, die sich unaufhörlich von einer Membran abschnüren und mit einer anderen verschmelzen (z.B. der Zellmembran):



052: Die Membran des ER, Golgi oder anderer Zellorganelle sind in zwei Farben dargestellt: blau ist die dem Lumen des Kompartiments zugewandte Seite, rot die dem Cytoplasma zugewandte Seite. Verschmelzen Transportvesikel mit einem dieser Kompartimente, so wird diese Regel stets aufrechterhalten: dementsprechend ist das Lumen aller dieser Kompartimente mit dem Extrazellularraum identisch

Der Verkehr läuft in geordneten Bahnen: der **biosynthetische Ausscheidungsweg** führt aus dem ER hinaus **zum Golgi-Apparat** und **zur Zelloberfläche** (mit einer Nebenstrecke zu den Lysosomen); der **Endozytose-Weg** beginnt an der **Plasmamembran** und verläuft nach innen zu den **Endosomen** und **Lysosomen**. Zur Erfüllung seiner Funktion dürfen Transportvesikel, die sich von einem Kompartiment trennen, nur die passenden Proteine mitnehmen und nur mit der richtigen Zielmembran verschmelzen. Ein Vesikel, das z.B. Fracht vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran bringt, muß diejenigen Proteine ausschließen, die im Golgi-Apparat bleiben sollen; und sie darf auch nur mit der Plasmamembran verschmelzen und nicht mit irgendeinem anderen Organell. Auch in diesem ständigen Fluß von Membranbestandteilen muß sich jedes Organell seine charakteristischen Eigenheiten bewahren. Wie dies geschieht wird, werden wir später noch sehen.

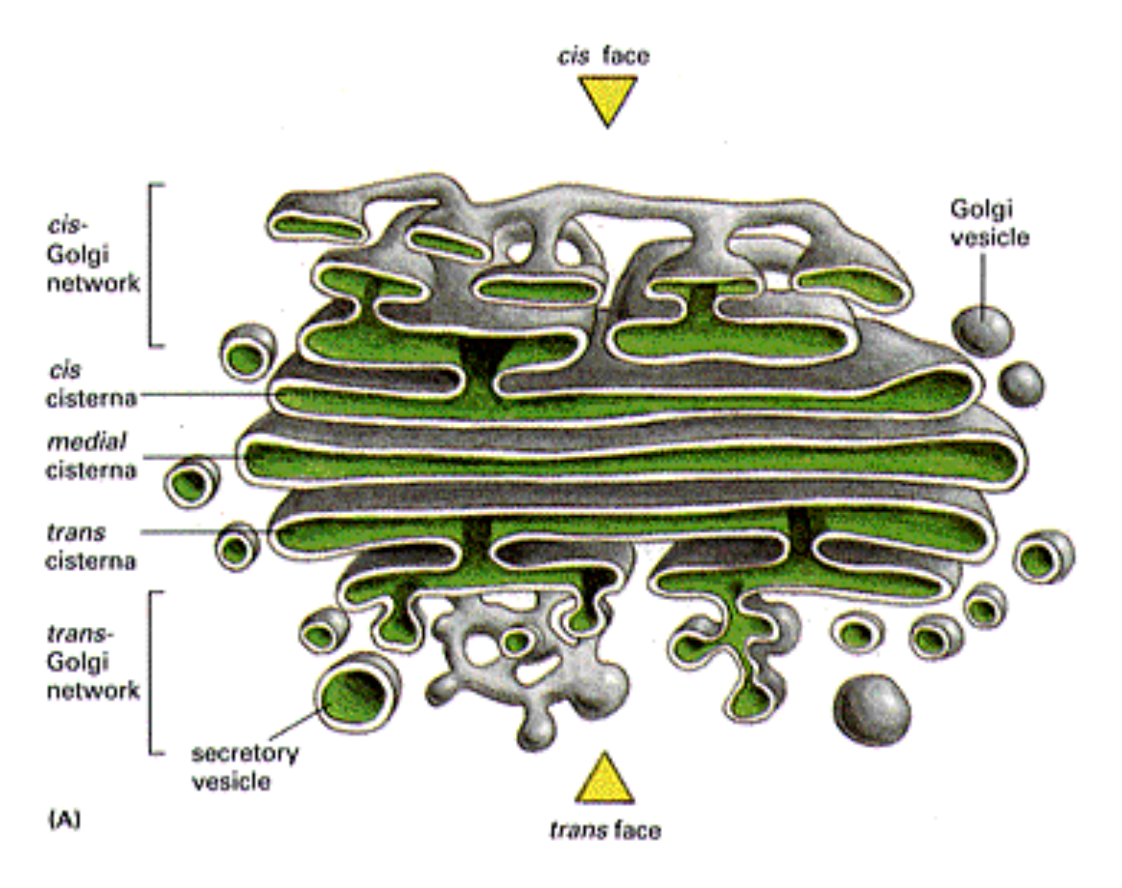


053: Jedes Kompartiment kann mit anderen Kompartimenten durch Transport-Vesikel kommunizieren. Der biosynthetisch/sekretorische Teil ist rot gekennzeichnet. Der Endozytose-Weg ist grün dargestellt. Alle Rückholwege (Recycling) sind blau dargestellt.

Der Golgi-Apparat besteht aus einer geordneten Folge von Kompartimenten. Der Golgi-Apparat liegt gewöhnlich in der Nähe des Zellkerns, und bei tierischen Zellen findet man ihn oft in der Nähe des Centrosom. Er besteht aus einer Ansammlung flacher, membranumhüllter Zisternen, die einem Mützenstapel ähneln. Jeder dieser Golgi-Stapel besteht gewöhnlich aus vier bis sechs Zisternen. Wie viele solche Stapel es in einer Zelle gibt, hängt stark vom Zelltyp ab: manche tierische Zellen enthalten einen großen, bestimmte Pflanzenzellen dagegen mehrere hundert kleine Golgi-Stapel.

Assoziiert mit den Golgi-Stapeln sind ganze „Schwärme" kleiner Vesikel, die gehäuft auf der dem ER zugewandten Seite und entlang dem erweiterten Rand der einzelnen Zisternen liegen. Diese Golgi-Vesikel transportieren, so nimmt man an, Proteine und Lipide zum Golgi-Apparat bzw. von ihm weg und von einer Zisterne zur anderen.

Jeder Golgi-Stapel hat zwei unterschiedliche Seiten: eine **cis-** oder **Bildungsseite** und eine **trans-** oder **Reifungsseite**. Beide Seiten, cis und trans, sind eng an besondere Kompartimente angeschlossen, die aus einem Netzwerk untereinander verbundener Röhren und Zisternen bestehen. Hierbei handelt es sich um das **cis-Golgi-Netz** bzw. das **trans-Golgi-Netz**. Proteine und Lipide kommen in Transportvesikeln aus dem ER in das cis-Golgi-Netz und verlassen das trans-Golgi-Netz wiederum in Transportvesikeln, die für die Zelloberfläche oder ein anderes Kompartiment bestimmt sind. Beide Netzwerke sind anscheinend für das Sortieren von Proteinen wichtig: Proteine, die ins cis-Golgi-Netz gelangen, können entweder weiter zum Golgi-Apparat ziehen oder ins ER zurückgebracht werden; Proteine, die aus dem trans-Golgi-Netz austreten, werden danach geordnet, ob sie in die Lysosomen, die sekretorischen Vesikel oder an die Zelloberfläche gehören.



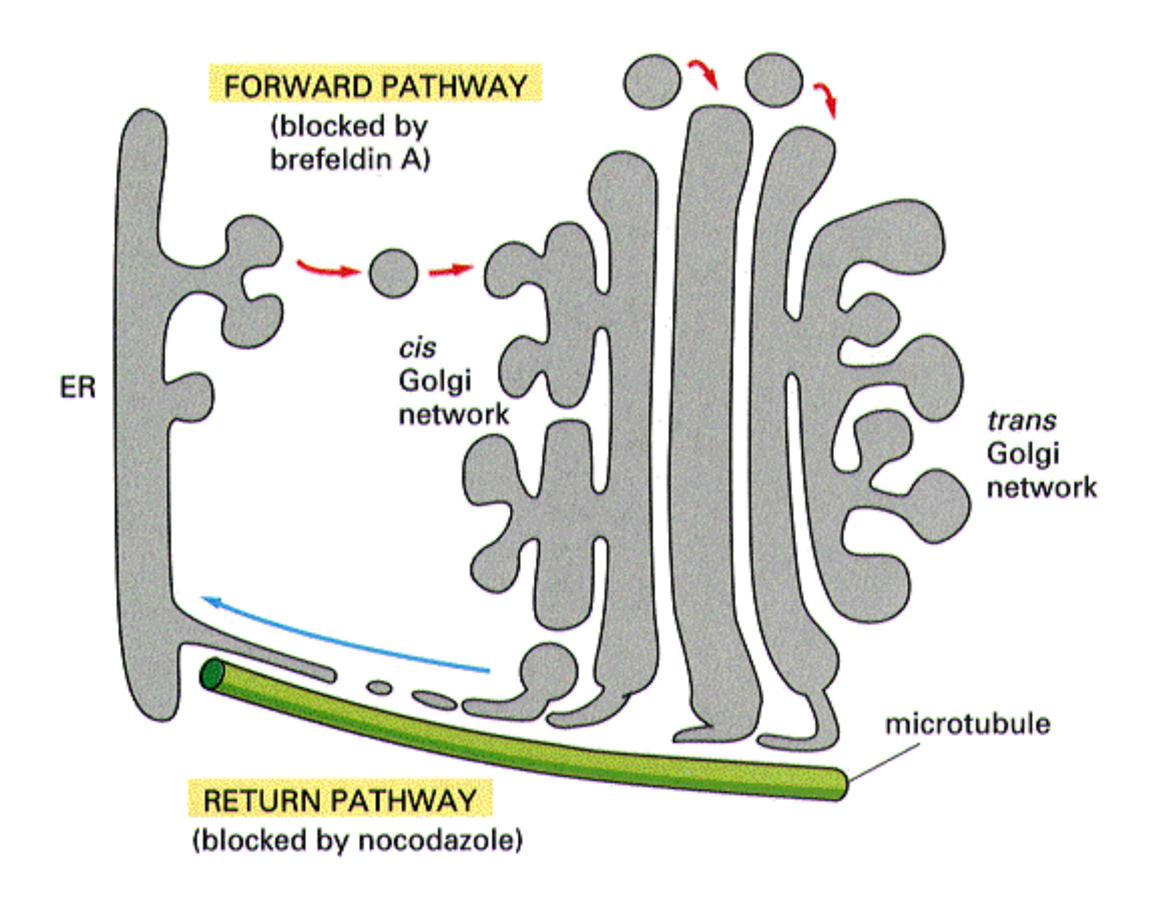
054: Dreidimensionale Rekonstruktion des Golgi-Apparates

Vesikel, die **für** den Golgi-Apparat bestimmt sind, schnüren sich von einem besonderen Bereich des ER, den sogenannten **Übergangselementen**, ab. Diese haben an ihrer Membran keine Ribosomen, und man findet sie häufig zwischen rauhem ER und Golgi-Apparat. Sie transportieren jedes Protein vom ER zum Golgi-Apparat. Es gibt jedoch eine strenge Bedingung für den Austritt von Proteinen oder Proteinkomplexen aus dem ER: sie müssen ordentlich gefaltet bzw. komplett zusammengesetzt sein. Ist das nicht der Fall, werden sie im ER zurückgehalten - entweder mit dem speziellen Bindungsprotein **BiP** verknüpft oder in nicht verpackbaren Aggregaten - und werden schließlich im ER abgebaut. Man kann den Ausgang des ER also als einen Ort der Qualitätskontrolle betrachten: wurden Faltung und Zusammenbau der Untereinheiten nicht erfolgreich abgeschlossen, wird das Protein verworfen. Tatsächlich ist das ER einer der Hauptorte des intrazellulären Proteinabbaus.

Richtig gefaltete Proteine benötigen kein besonderes Signal, um das ER verlassen zu können. Andere dagegen, die wie z.B. **BiP** ständiger Bestandteil des ER-Lumens sind, brauchen ein solches Signal, damit sie zurückgehalten werden. Das Zurückhalten löslicher ER-„sässiger" Proteine besorgt ein kurzes Sortiersignal aus vier Aminosäureresten, die man als **KDEL** (Lys-Asp-Glu-Leu) o.ä. identifiziert hat. Entfernt man dieses **ER-Rückhaltesignal** gentechnisch aus BiP, wird dieses Protein aus dem ER ausgeschieden. Überträgt man andererseits das Signal auf ein Protein, das normalerweise sezerniert wird, bleibt es jetzt im ER. Das Rückhaltesignal arbeitet aber nicht wie ein Anker für die im ER-Lumen ansässigen Proteine, sondern ermöglicht deren exklusives Wiederauffinden, nachdem sie in Transportvesikeln verschwunden und ins cis-Golgi-Netz gebracht worden sind. Dort bindet ein spezifisches, membrangebundenes Rezeptorprotein an das ER-Rückhaltesignal und packt alle Proteine, die dieses Signal tragen, in besondere Transportvesikel, in denen sie ins ER zurückbefördert werden.

Die fortwährende Rückholung von ER-Proteinen aus dem cis-Golgi-Netz zeigt, daß der Transport zwischen diesen beiden Organellen in beide Richtungen stattfindet. Auch in den späteren Golgi-Kompartimenten existieren Rezeptoren für das ER-Rückhaltesignal. Das deutet

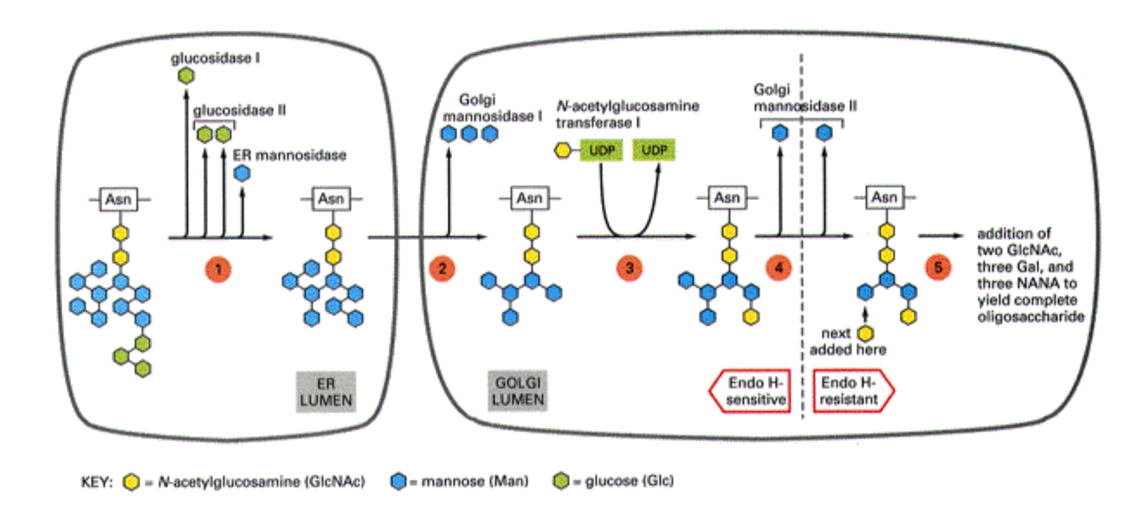
auf einen Rückweg von diesen Kompartimenten zum ER hin. Experimente mit dem Wirkstoff **Brefeldin A** unterstreichen dramatisch die Bedeutung dieses Weges: die Proteinsekretion ist durch die Zerstörung des Golgi-Apparates blockiert. In mit Brefeldin A behandelten Zellen ist der Golgi-Apparat zum größten Teil verschwunden, seine Proteine kommen am Ende ins ER, mit dessen Proteinen sie sich vermischen. Entfernt man den Wirkstoff, bildet sich der Golgi-Apparat wieder neu, und die Golgi-Proteine kehren wieder in ihre angestammten Kompartimente zurück. Der Rücktransport wird vermutlich durch den Kontakt zu **Mikrotubuli** begünstigt. Deshalb ist der Rücktransport auch durch **Nocodazol** hemmbar.



055: Blockierung des Transports vom ER zum cis-Golgi-Netz durch Brefeldin A; Hemmung des Rücktransports durch Nododazol

Neben den Transportaufgaben des Golgi-Netzwerkes, ist eine der Hauptaufgaben dieses Kompartiments die sogenannte Glykosylierung. Dabei werden die bereits glykosylierten Proteine aus dem ER nachträglich noch modifiziert, bevor sie als Glykoproteine in die Zellmembran

eingebaut oder sezerniert werden. Diese Prozesse sind streng geordnet, wobei die bereits angehefteten Zuckermoleküle (siehe N-Glykosylierte Proteine Seite 62) weiter modifiziert werden.



056: bereits im **ER**: Entfernung der Glucose-Reste und eines Mannose-Restes. im **Golgi**: Entfernung weiterer Mannose-Reste; Transfer eines N-AcGlc-Restes; Entfernung weiterer Mannose-Reste bis auf Trimer; Transfer eines weiteren N-AcGlc-Restes: Resistenz gegenüber **Endoglykosidase H** (Endo H); weiter Anheftungen möglich (N-AcGlc, Galaktose, Sialinsäurereste)

Die Bearbeitungs(„processing")-Reaktionen für Oligosaccharide laufen in genau abgestimmter Reihenfolge im Golgi-Apparat ab, wobei jede Zisterne ihre eigene Sammlung von weiterverarbeitenden Enzymen besitzt. Die Proteine wandern von einer Zisterne zur anderen durch den Stapel und werden dabei schrittweise modifiziert. Der Stapel stellt also eine vielstufige Verarbeitungs-Einheit dar.

Neben den Glykosylierungen an den Asparagin-Resten finden im Golgi-Apparat auch Modifikationen an Serin- oder Threonin-Seitenketten der Proteine statt. Der als **O-Glykosylierung** bezeichnete Prozess ist eminent wichtig für eine ganze Reihe von Proteinen, die entweder sezerniert werden oder in den Zellkern gelangen.

Die O-Glykosylierung wird durch eine Reihe von **Glycosyltransferase-Enzymen** katalysiert; sie benutzen die Zuckermoleküle im Golgi-Lumen und heften einen Zuckerrest nach dem anderen an das Protein. Gewöhnlich wird zunächst ein **N-Acetylgalactosamin** angehängt, dann eine wechselnde Zahl (2-10) weiterer Zuckerreste.

Die am stärksten glykosylierten Proteine überhaupt sind **Proteoglykan-Kernproteine**, die im Golgi-Apparat zu Proteoglykanen umgeformt werden. Dabei kommt es zur Polymerisation einer oder mehrerer **Glykosaminoglykan-Ketten** (das sind lange, unverzweigte Polymere aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten), die an Serin-OH-Gruppen des Proteins über einen **Xylose-Rest** angefügt werden. Proteoglykane werden ausgeschieden und bilden Bestandteile der extrazellulären Matrix, andere bleiben in der Plasmamembran verankert. Wiederum andere sind Hauptbestandteil des schleimigen Materials, wie es z.B. als Schutzschicht für viele Epithelien ausgeschieden wird. Die Zuckerbausteine der **Glykosaminoglykane** komplexieren im Golgi-Apparat mit **Sulfatgruppen**; das trägt zur starken **negativen Ladung** der **Proteoglykane** bei.

- **DER ENDOSOMEN UND LYSOSOMEN**

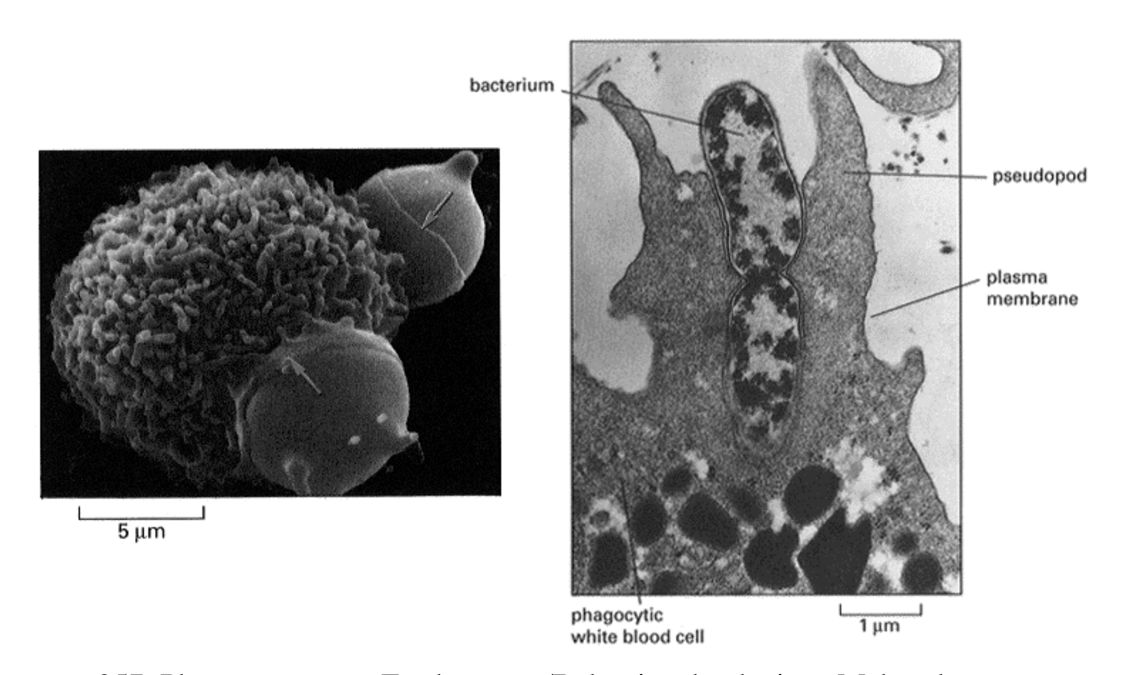
  Alle Wege von der Zelloberfläche zu den Lysosomen beginnen bei dem als **Endozytose** bezeichneten Prozess, durch den sich Zellen Makromoleküle, bestimmte Substanzen und in einigen Fällen sogar andere Zellen einverleiben. Das aufzunehmende Material wird von einem kleinen Teil der Plasmamembran eingehüllt, der sich zunächst einstülpt und dann abschnürt. So entsteht ein intrazelluläres Vesikel, das einverleibte Substanzen oder Teilchen enthält. Je nach Größe der gebildeten endozytotischen Vesikel unterscheidet man **zwei Haupttypen** der Endozytose: durch **Pinozytose** („Zell-Trinken") werden Flüssigkeiten und gelöste Substanzen in kleine Vesikel (Durchmesser ca. 150 nm) aufgenommen. Durch **Phagozytose** („Zell-Fressen") gelangen umfangreiche Partikel, z.B. Mikroorganismen und Zelltrümmer, über große Vesikel - sogenannte Phagosomen mit einem Durchmesser von gewöhnlich über 250 nm - in die Zelle. Die meisten Eukaryontenzellen nehmen ständig Flüssigkeiten und gelöste Stoffe durch Pinozytose auf; große Partikel dagegen werden hauptsächlich von spezialisierten, phagozytierenden Zellen „gefressen".

  Für **Protozoen** ist die Phagozytose eine Form der Nahrungsaufnahme: große Partikel, die von Phagosomen aufgenommen wurden, gelangen schließlich in Lysosomen, und die Produkte der dort stattfindenden Verdauungsvorgänge werden ins Cytoplasma gebracht und als Nahrung verwertet. In **vielzelligen Organismen** sind jedoch nur wenige Zellen in der Lage, große Teilchen richtig aufzunehmen. In **Säugern** gibt es unter den weißen Blutzellen zwei Klassen von Phagozyten: die **Monozyten/Makrophagen**, die im Gewebe und im Blut weit verbreitet sind, und die **neutrophilen Leukozyten**. Diese beiden Zelltypen schützen uns vor Infektionen, indem sie eingedrungene Mikroorganismen auffressen. Makrophagen haben außerdem eine wichtige Funktion bei der Beseitigung alter und beschädigter Zellen und ihrer Überreste. Diese zweite Funktion sehr wichtig: Makrophagen fressen in unserem Körper jeden Tag mehr als 10^{11} ausgediente rote Blutkörperchen.

  Die Phagosomen verschmelzen mit **Lysosomen**, und das aufgenommene Material wird abgebaut. Unverdaubare Substanzen verbleiben in

den Lysosomen und bilden die sogenannten **Restkörperchen**. Einige der aufgenommenen Plasmamembran-Bestandteile werden durch Transportvesikel aus dem Phagosom zur Plasmamembran zurückgebracht.

Bevor ein Partikel phagozytiert werden kann, muß es an die Oberfläche des Phagozyten binden; es werden jedoch nicht alle Partikel, die sich an die Zelle heften, auch in sie aufgenommen. Phagozyten besitzen auf ihrer Oberfläche ein Spektrum **spezialisierter Rezeptoren**, deren Funktion an den Phagozytose-Apparat gekoppelt ist. Anders als die Pinozytose, die als kontinuirlicher Prozeß ständig abläuft, muß die Phagozytose erst ausgelöst werden: aktivierte Rezeptoren müssen ein Signal in das Zellinnere übermitteln und setzen damit eine Reaktion in Gang.



057: Phagozytose von Erythrozyten/Bakterien durch einen Makrophagen

Die am besten charakterisierten derartigen Auslöser sind **Antikörper**; sie schützen uns vor Infektionen durch Mikroorganismen, indem sie an deren Oberfläche binden und um sie eine Hülle bilden, wobei der Schwanzbereich der Antikörper (die sogenannte Fc-Region) nach außen gerichtet ist. Diese Antikörperhülle wird von spezifischen **Fc-Rezeptoren** erkannt, die auf der Oberfläche von Makrophagen und neutrophilen Leukozyten sitzen. Die Bindung Antikörper-bedeckter

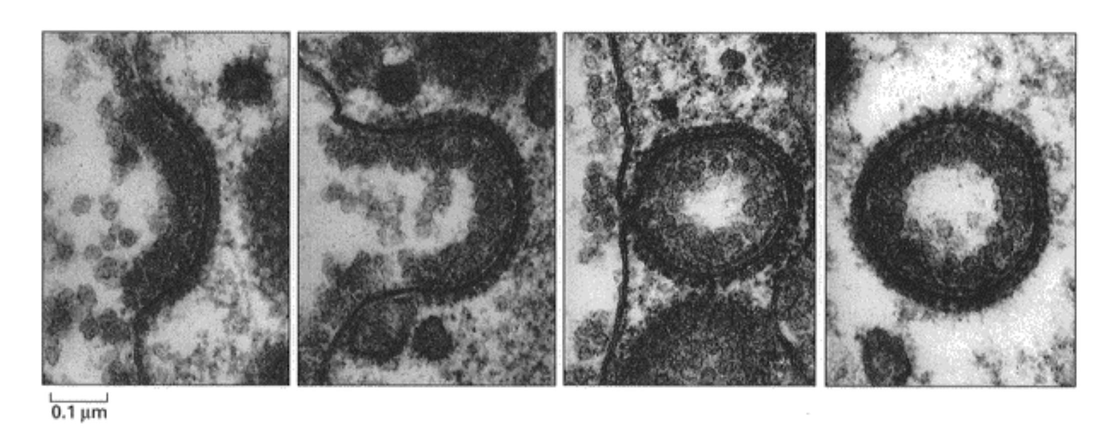
Partikel an diese Rezeptoren veranlaßt die phagozytotische Zelle, Pseudopodien auszustrecken, welche die Partikel umschließen und durch Verschmelzung ihrer Enden ein Phagosom bilden.

Man hat inzwischen einige **andere Klassen von Rezeptoren**, die die Phagozytose fördern, charakterisiert: zum Beispiel erkennen sie das **Komplementsystem** (eine Gruppe von Molekülen, die im Blut kreisen und zusammen mit den Antikörpern unerwünschte Zellen „opsonieren") oder sie reagieren auf Oberflächen-Oligosaccharide bestimmter **Mikroorganismen**. Welche Rezeptoren auf den Makrophagen **überalterte** oder **geschädigte Zellen** erkennen, weiß man nicht, allerdings scheinen in einigen Fällen Zelladhäsions-Proteine der **Integrin-Familie** beteiligt zu sein.

Praktisch alle Eukaryontenzellen nehmen ständig kleine **pinozytotische Vesikel** auf, die später wieder an die Zelloberfläche zurückkehren. Die Geschwindigkeit, mit der die Plasmamembran durch diese Pinozytose resorbiert wird, variiert je nach Zelltyp, ist im allgemeinen aber sehr hoch. Ein **Makrophage** nimmt zum Beispiel je Stunde **25%** seines eigenen Flüssigkeitsvolumens auf; demnach wird - rein rechnerisch - **alle 30 Minuten** die komplette Plasmamembran rückresorbiert. Bei **Fibroblasten** läuft die Endozytose etwas langsamer ab. Oberfläche und Volumen einer Zelle bleiben während der Endozytose unverändert; demnach wird die gleiche Membranmenge, die durch diesen Vorgang in die Zelle gelangt, durch **Exozytose** wieder zur Zelloberfläche gebracht. In diesem Sinne sind **Endozytose** und **Exozytose** gekoppelte Prozesse, so daß man von einem Endozytose/Exozytose-Zyklus spricht.

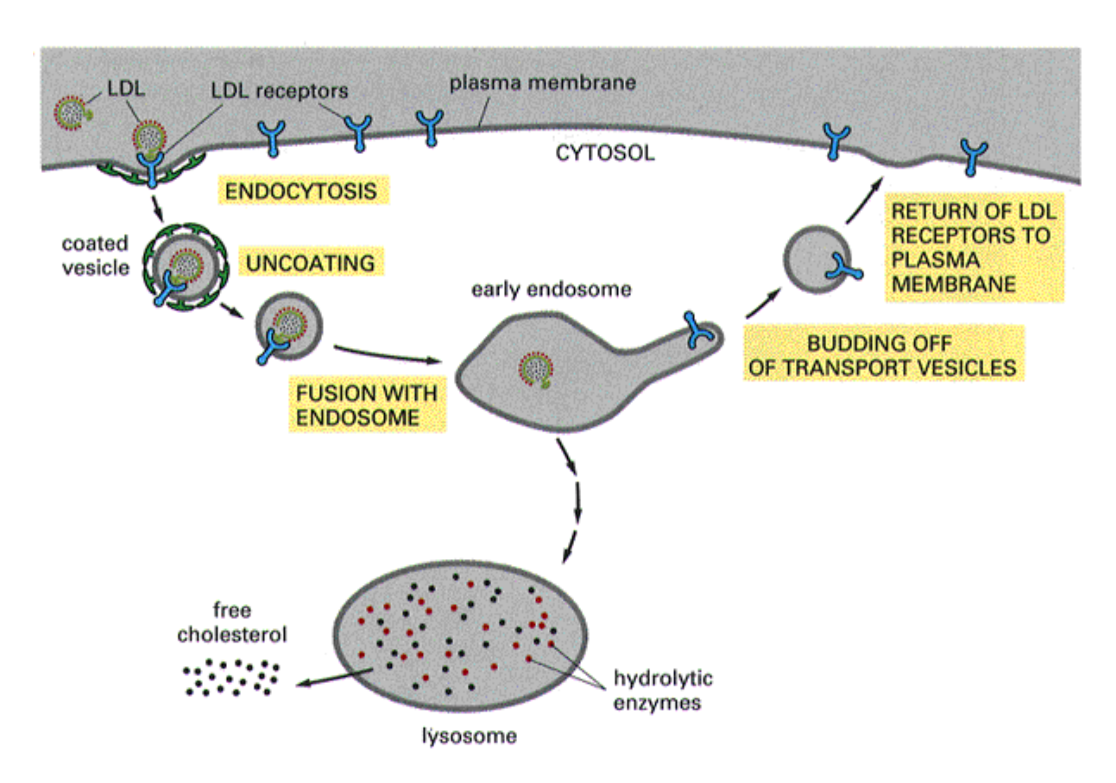
Der endozytotische Zyklusteil beginnt in spezialisierten Bereichen der Plasmamembran, den **Clathrin-coated Pits**; sie nehmen in der Regel **2%** der Gesamtfläche der Plasmamembran ein. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von schockgefrorenen und tiefgeätzten Plasmamembranen erscheinen diese als Einstülpungen der Membran, die auf ihrer Innenseite mit dicht gepacktem Material verkleidet sind. Dieser Belag besteht aus dem Protein **Clathrin**, das zusammen mit anderen Proteinen einen charakteristischen Käfig bildet. Die Clathrin-coated Pits haben nur eine kurze Lebensdauer: vom Augenblick ihrer Entstehung an vergeht ungefähr eine Minute, in der sie sich in die Zelle

einstülpen und abschnüren; auf diese Weise entstehen **Clathrin-coated Vesicles**. Bei einem Fibroblasten in Gewebekultur verlassen schätzungsweise in jeder Minute etwa 2.500 dieser Vesikel die Plasmamembran. Die Clathrin-coated Vesicles sind noch kurzlebiger als die Coated Pits: schon wenige Sekunden, nachdem sie sich gebildet haben, streifen sie ihre Hülle ab und können dann mit **frühen Endosomen** verschmelzen. Wenn sich die Coated Pits einstülpen und Coated Vesicles bilden, wird auch extrazelluläre Flüssigkeit mit eingeschlossen. Die in ihr gelösten Stoffe werden ebenfalls aufgenommen, und den betreffenden Vorgang nennt man **Flüssigphase-Endozytose**.



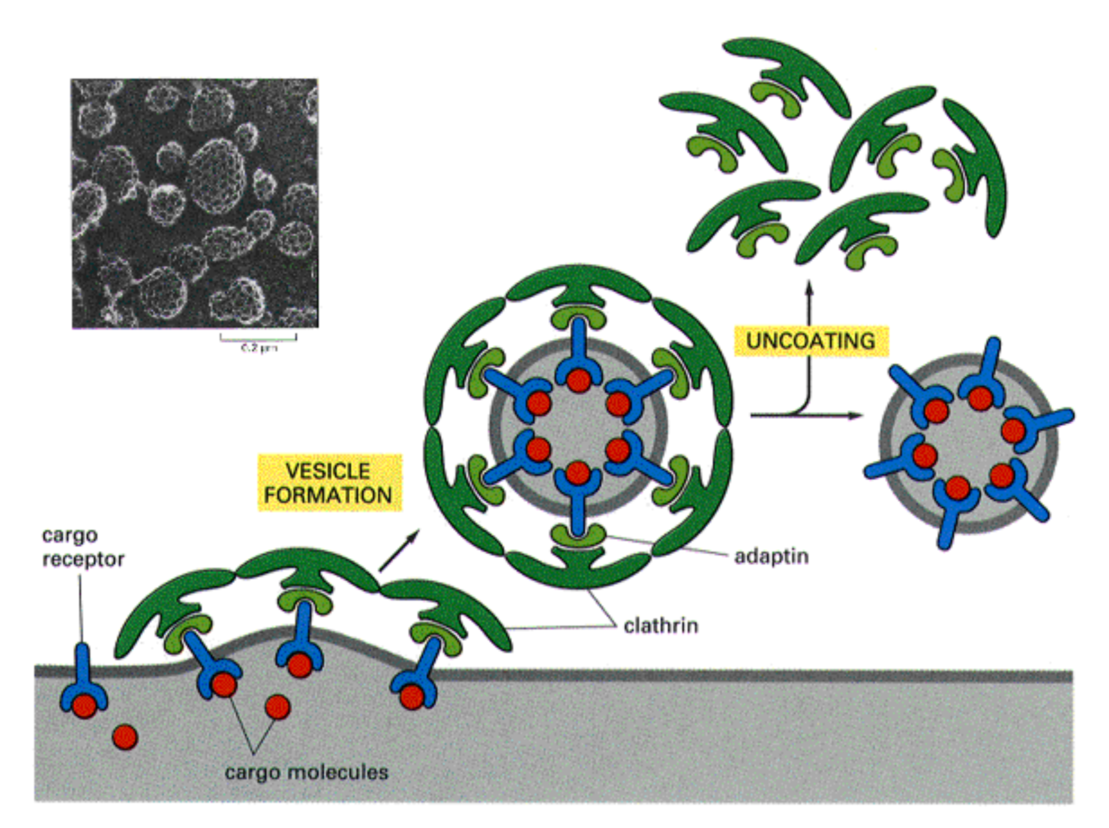
058: Flüssigphasen-Endozytose

Für die meisten tierischen Zellen sind die "Clathrin-bedeckten Pits" und Vesikel ein wirksames Hilfsmittel zur Aufnahme spezifischer Makromoleküle aus der extrazellulären Flüssigkeit - ein Vorgang, den man als **Rezeptor-vermittelte Endozytose** bezeichnet. Die Makromoleküle binden an komplementäre **Zelloberflächen-Rezeptoren**, sammeln sich in coated Pits und gelangen als Rezeptor-Makromolekül-Komplexe in den Clathrin-bedeckten Vesikeln in die Zelle. Durch die Rezeptor-vermittelte Endozytose werden bestimmte Makromoleküle selektiv angereichert, und daher steigert sie den Wirkungsgrad, mit der einzelne Liganden aufgenommen werden, um mehr als das **1.000-fache**. Auf diese Weise können selbst schwach konzentrierte Bestandteile der extrazellulären Flüssigkeit spezifisch in großer Menge aufgenommen werden, ohne daß eine entsprechend große Flüssigkeitsmenge in die Zelle gelangen muß. Ein besonders gut aufgeklärtes und physiologisch wichtiges Beispiel ist der Prozeß, durch den Säugetier-Zellen **Cholesterin** aufnehmen.



059: Resorption von LDL durch den LDL-Rezeptor: Bildung von "Clathrin coated pits" und Fusion mit frühen Endosomen.

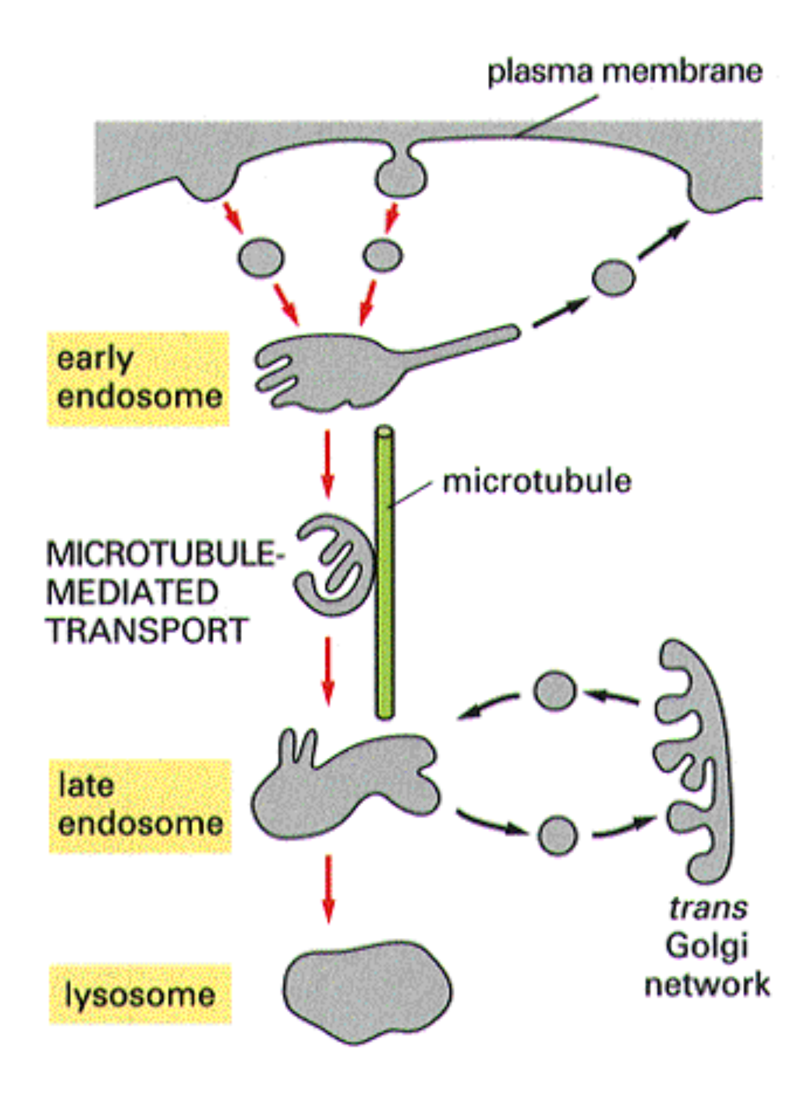
Die Zusammensetzung der Hülle auf einem Clathrin-bedeckten Vesikel erfüllt vermutlich zwei Funktionen: es liefert die mechanische Kraft, die die Membran in eine Knospe zieht, und es hilft beim Einfangen spezifischer Membranrezeptoren und deren angebundener Frachtmoleküle. Das zweitwichtigste Hüllprotein in diesen Vesikeln - **Adaptin**, ein Komplex aus vielen Untereinheiten - spielt bei beiden Funktionen eine Rolle. Adaptine werden benötigt, um den Clathrin-Belag an die Membran zu binden und verschiedene Transmembran-Rezeptorproteine zu greifen, welche wiederum spezifische Frachtmoleküle in den Vesikeln einfangen. Auf diese Weise wird jeweils ein bestimmter Satz von Frachtmolekülen - an ihre spezifischen Frachtrezeptoren gebunden - in das Lumen einer jeden neu gebildeten, Clathrin-belegten Transportvesikel aufgenommen.



060: Durch Anlagerung der spezifischen Adaptine und der Clathrin Moleküle beginnt sich die Membran einzustülpen und es schnürt sich ein Vesikel ab. Nach dem "uncoating" können diese Vesikel mit den frühen Endosomen verschmelzen.

Das Endosomen-Kompartiment läßt sich im Elektronenmikroskop darstellen, wenn man ein leicht erkennbares Indikatormolekül - z.B. das **Enzym Peroxidase** ins extrazelluläre Medium gibt; die Zellen haben dann unterschiedlich lange Zeit, die Substanz durch Endozytose aufzunehmen. Die anschließende Verteilung des Moleküls zeigt, daß das Endosomen-Kompartiment eine komplizierte Gruppe uneinheitlicher, membranumhüllter Röhren und Vesikel ist, die sich von der Zellperipherie bis in die Gegend des Zellkerns erstrecken; dort liegen sie oft in der Nähe des Golgi-Apparats, sind aber deutlich von ihm abgegrenzt. Man kann in solchen Markierungsexperimenten zwei Gruppen von Endosomen unterscheiden: in den **frühen Endosomen**, gerade unterhalb der Plasmamembran, taucht der Indikator nach etwa **einer Minute** auf; nach **5 bis 15 Minuten** findet man ihn in den **späten Endosomen**, ganz in der Nähe von Golgi-Apparat und Zellkern.

Der Innenraum des Endosomen-Kompartiments ist leicht sauer (pH-Wert ~ 6), denn in der Endosomenmembran sind ATP-getriebene H^+-Pumpen eingelagert, die H^+-Ionen aus dem Cytoplasma in das Endosomenlumen befördern; im allgemeinen sind späte Endosomen saurer als frühe. Das saure Milieu ist für die Funktion dieser Organellen von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund findet man in allen an Endo- und Exozytose beteiligten Organellen einen sauren pH-Wert im Lumen, also auch in **Phagosomen**, **Lysosomen**, bestimmten Teilen des **Golgi-Apparats** und in vielen **sekretorischen** und **Transportvesikeln**. Das endozytosierte Material, das in die späten Endosomen gelangt, wird mit neu synthetisierten sauren Hydrolasen gemischt bevor es zum Abbau in Lysosomen gelangt.

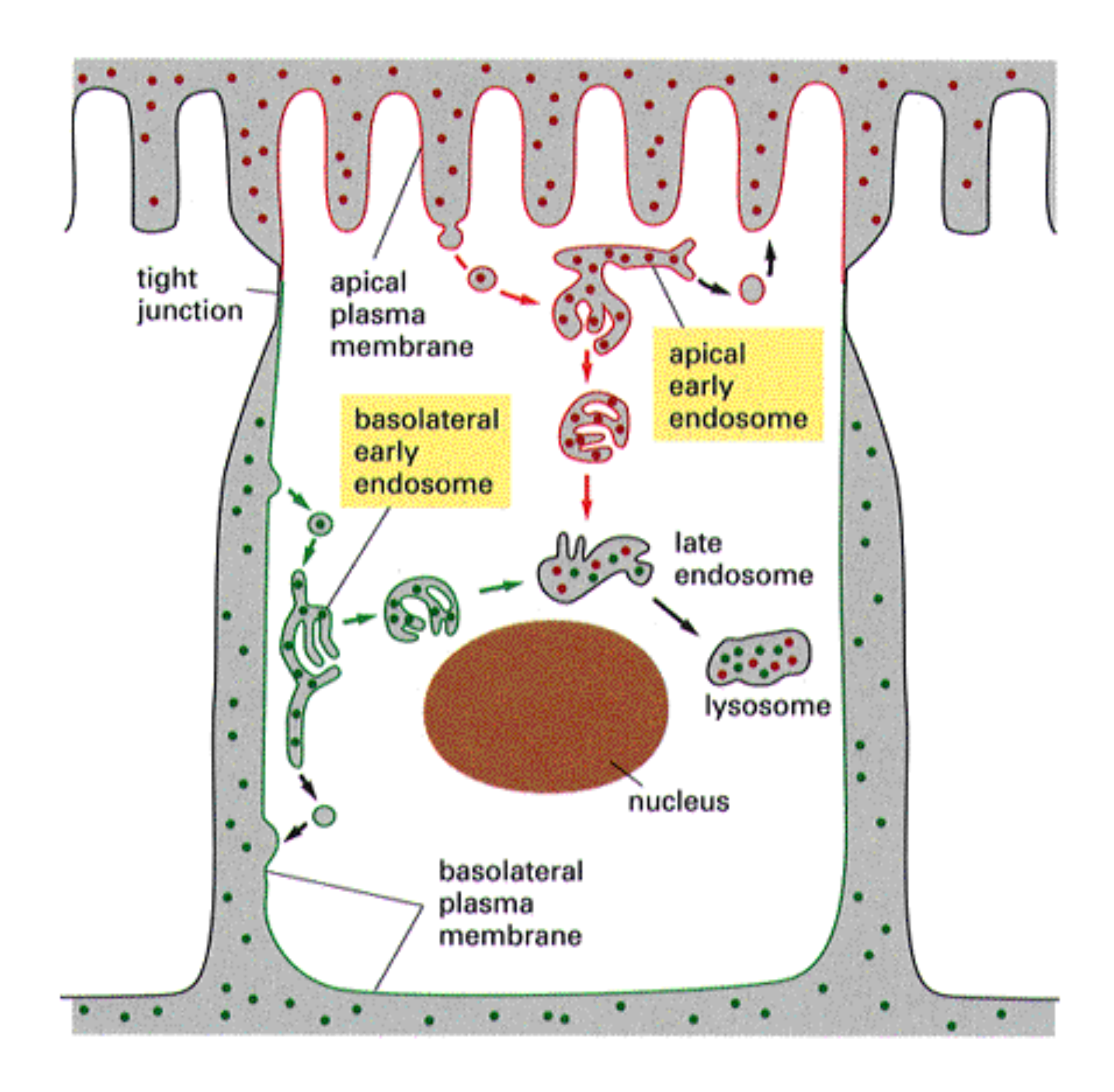


061: Der Endosomen Transportweg

Das frühe Endosomen-Kompartiment ist die wichtigste **Sortierstelle** auf dem **Endozytose-Transportweg**; es hat also die gleiche Funktion, die das trans-Golgi-Netz für den biosynthetisch-sekretorischen Transportweg erfüllt. Im sauren Milieu eines frühen Endosoms verändern viele der aufgenommenen Rezeptorproteine ihre Konformation und lassen ihren Liganden frei. Diejenigen endozytierten Liganden, die im frühen Endosom von ihren Rezeptoren dissoziieren, werden gewöhnlich zusammen mit anderen, nicht membrangebundenen Endosomen-Inhaltsstoffen dem Abbau in den Lysosomen zugeführt. Die meisten Rezeptoren kehren zur Plasmamembran zurück, einige gelangen weiter in die Lysosomen und werden dort abgebaut.

Manche Rezeptoren auf der Oberfläche **polarer Epithelzellen** (z.B. Dünndarmzellen) transportieren spezifische Makromoleküle von einem extrazellulären Raum zum anderen - ein Vorgang, den man als **Transzytose** bezeichnet. Diese Rezeptoren schlagen von den Endosomen aus einen dritten Transportweg ein. An spezifische Rezeptoren gebundene Substrate werden über Clathrin-coated Pits und Vesikel in die Zellen und dort zu den frühen Endosomen gebracht. Die Rezeptor-Substrat-Komplexe bleiben intakt und werden in Transportvesikel verpackt, die sich vom frühen Endosom abschnüren und dann mit der **basolateralen Domäne** der Plasmamembran verschmelzen. Im neutralen pH-Wert bereich der extrazellulären Flüssigkeit, die die basolaterale Oberfläche der Zellen umspült, dissoziieren die Substrate von ihren Rezeptoren und gelangen ins Blut und von dort zur Leber.

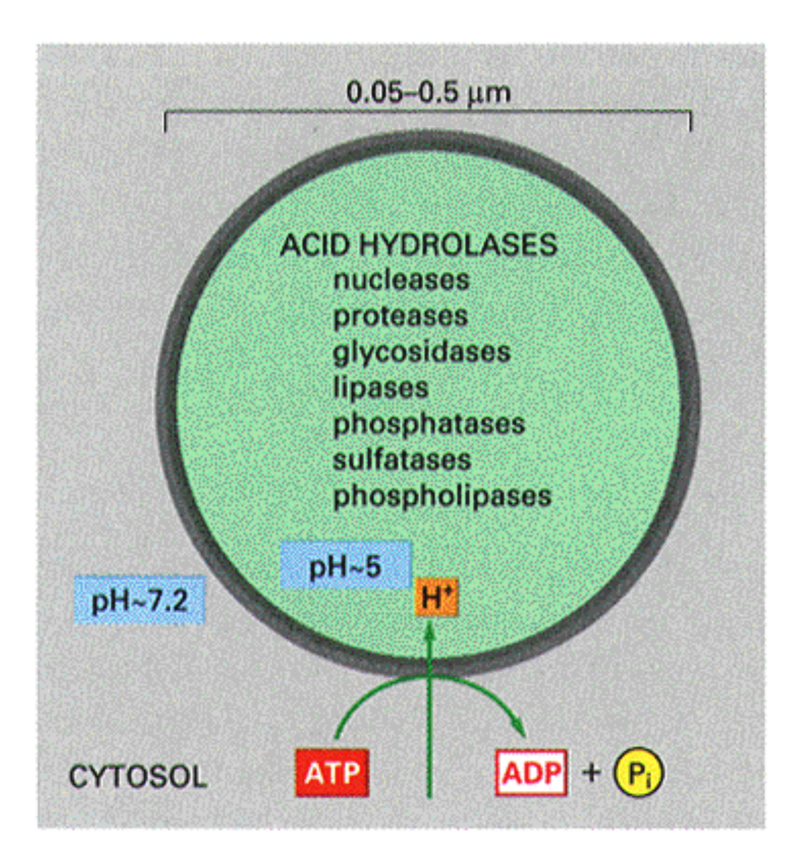
Die Tatsache, daß Rezeptoren von den Endosomen aus so unterschiedliche Wege einschlagen können, läßt einige Rückschlüsse zu: Vermutlich besitzen viele Rezeptoren nicht nur Bindestellen für ihre Liganden und für die coated Pits, sondern darüber hinaus auch noch Sortiersignale, die sie zum richtigen Transportvesikel, das das frühe Endosom verläßt, und damit letztendlich zur richtigen Zielmembran in der Zelle dirigieren.



062: Transzytose Transportweg am Beispiel einer Dünndarmzelle

Lysosomen sind Membransäckchen angefüllt mit hydrolysierenden Enzymen für die kontrollierte intrazelluläre Verdauung von Makromolekülen. Sie enthalten ungefähr **40 Arten** hydrolysierender Enzyme, darunter **Proteasen**, **Nucleasen**, **Glykosidasen**, **Lipasen**, **Phospholipasen**, **Phosphatasen** und **Sulfatasen**. Sie alle sind **saure Hydrolasen**. Ihr Aktivitätsoptimum erreichen sie in saurer Umgebung, das Lysosom hält dafür in seinem Innern einen pH-Wert von ungefähr 5 aufrecht. Auf diese Weise sind die Inhaltsstoffe des Cytoplasmas doppelt vor einem Angriff des zelleigenen Verdauungssystems geschützt. Normalerweise sind die Enzyme durch die Lysosomenmembran vom Cytoplasma getrennt, aber selbst bei einer Undichtigkeit

können sie im Cytoplasma bei einem pH-Wert von 7,2 nur geringe Schäden anrichten.

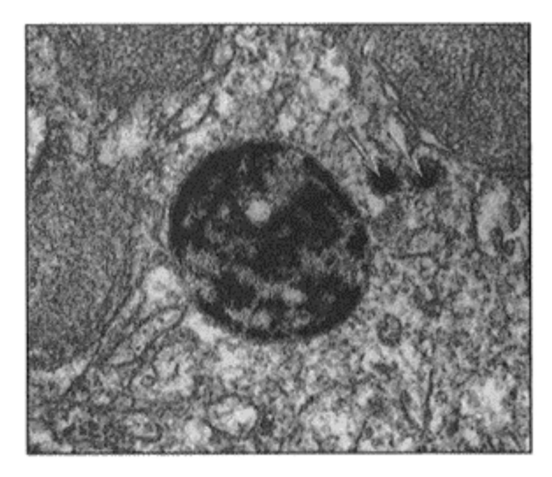


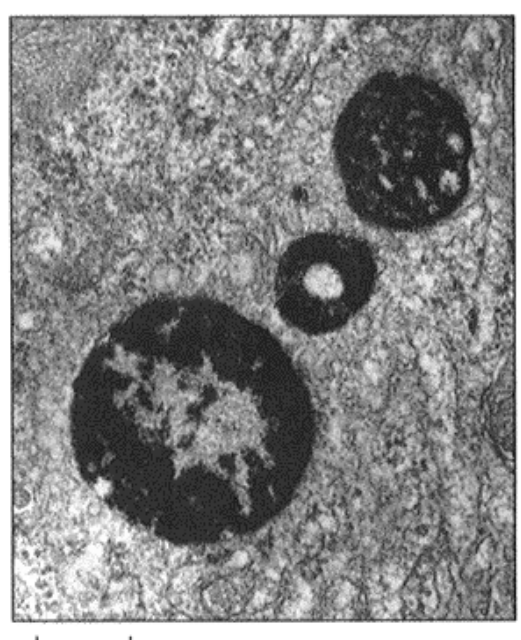
063: Lysosomen beinhalten saure Hydrolasen und eine Protonenpumpe

Wie alle anderen intrazellulären Organellen, besitzt auch das Lysosom nicht nur eine eigene Enzymausstattung, sondern auch eine **spezielle Membranhülle**. Transportproteine in dieser Membran erlauben den Endprodukten des Makromolekül-Abbaus wie z.B. **Aminosäuren**, **Zuckern** und **Nucleotiden**, ins Cytoplasma zu gelangen, von wo sie ausgeschieden oder in der Zelle erneut verwendet werden können. Eine H^+-Pumpe in der Lysosomenmembran **hydrolysiert ATP** und transportiert mit der dabei gewonnenen Energie H^+-Ionen in das Lysosom (**pH-Unterschied ist > 2!**). Die meisten Proteine in der Lysosomenmembran sind ungewöhnlich stark glykosyliert - wahrscheinlich zum Schutz gegen die Proteasen im Lumen des Organells.

Lysosomen wurden zuerst durch biochemische Zerlegung von Zellextrakten entdeckt und später dann auch im Elektronenmikroskop eindeutig dargestellt. Sie sind in Form und Größe außerordentlich ver-

schieden. Daß es sich dennoch um eine einzige Familie von Organellen handelt, kann man mit Hilfe der Histochemie zeigen, und zwar anhand des Niederschlags, der sich bei der Reaktion einer sauren Hydrolase mit ihrem Substrat bildet und damit anzeigt, welche Organellen das Enzym enthalten. Lysosomen, die diesem Kriterium entsprechen, findet man in allen Eukaryontenzellen.





064: Histochemische Darstellung von Lysosomen: die Färbung zeigt die Lage der sauren Phosphatase, eines Marker-Enzyms für Lysosomen. Die größeren, membranumhüllten Organellen, die einen dunklen Niederschlag aus Bleiphosphat enthalten, sind Lysosomen; die Niederschläge entstehen, wenn man das Gewebe mit Glutaraldehyd fixiert und anschließend in Gegenwart von Blei-Ionen mit einem Substrat für die Phosphatase inkubiert.

Die uneinheitliche Morphologie der Lysosomen steht im Gegensatz zu der relativ einheitlichen Struktur der meisten anderen Zellorganellen. In diesen Unterschieden spiegelt sich das Spektrum der Verdauungsfunktionen wider, für die die sauren Hydrolasen verantwortlich sind, zum Beispiel der Abbau intra- und extrazellulärer Abfälle, die Verdauung phagozytosierter Mikroorganismen. Aus diesem Grund betrachtet man Lysosomen manchmal als eine uneinheitliche Gruppe verschiedenartiger Organellen, deren gemeinsames Merkmal ein hoher Gehalt an hydrolysierenden Enzymen ist.

Ganz allgemein betrachtet sind Lysosomen die Knotenpunkte mehrerer Bahnen des intrazellulären Verkehrs: Verdauungsenzyme gelangen über ER und Golgi-Apparat zu den Lysosomen; abzubauende Substanzen erreichen je nach Herkunft die Lysosomen auf mindestens drei Wegen:

1. **Der Endosomen-Transportweg** (siehe Seite 79). Hier verschmelzen zwei Ströme von Transportvesikeln, denn das abzubauende Material trifft zum erstenmal die lysosomalen Hydrolasen, die aus dem Golgi-Apparat gekommen sind. Das Innere der späten Endosomen ist schwach sauer und vermutlich der Ort, an dem der hydrolytische Abbau der aufgenommenen Moleküle beginnt. Aus den späten Endosomen entwickeln sich reife Lysosomen. Während der Umwandlung gehen einige Endosomen-spezifische Membranproteine verloren, und es kommt zu einem weiteren Absinken des pH im Innern.

2. **Autophagie**. Lysosom aller Zelltypen benutzen diesen Vorgang, um überflüssige Bestandteile der Zelle zu beseitigen. In einer Leberzelle zum Beispiel beträgt die durchschnittliche Lebensdauer eines Mitochondriums ungefähr 10 Tage, und in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von normalen Zellen finden sich Lysosomen, die Mitochondrien und andere Organellen enthalten und verdauen. Zu Beginn dieses Prozesses wird ein Organell von Membranen eingeschlossen, die vom ER stammen; es entsteht ein **Autophagosom**, das dann mit einem Lysosom (oder einem späten Endosom) verschmilzt.

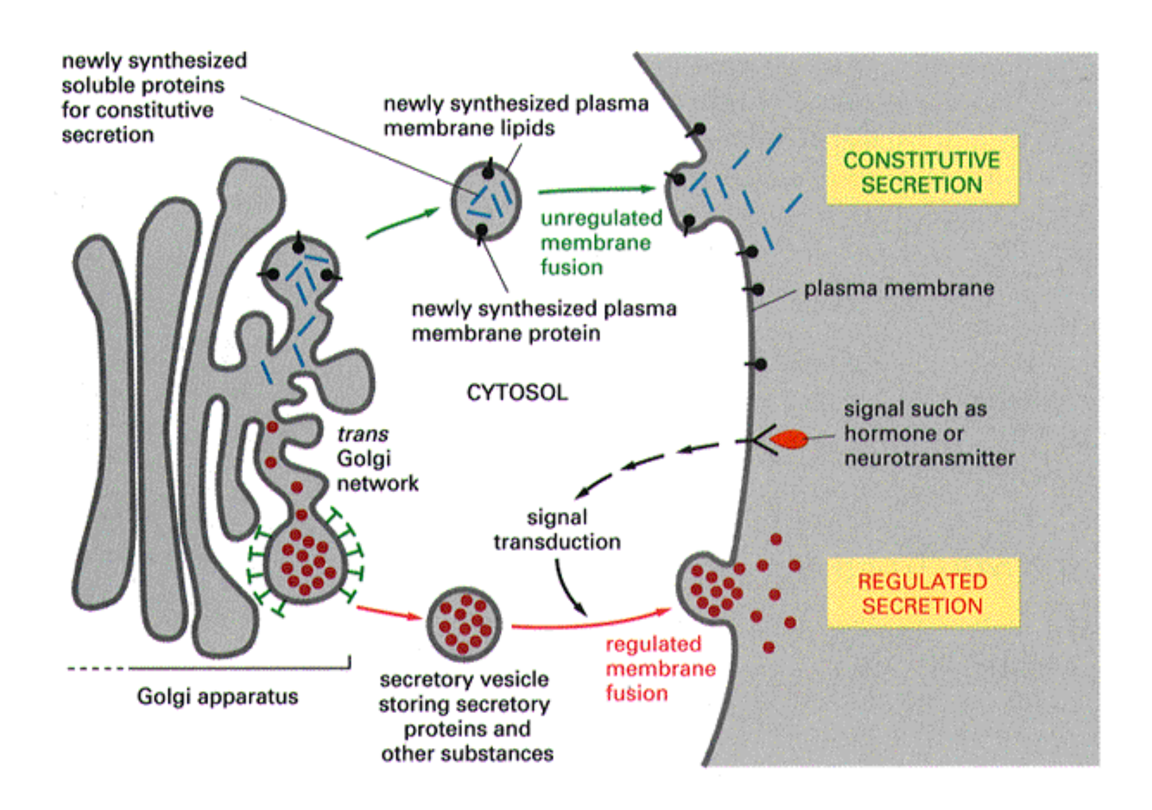
3. **Spezifischer Transport.** Proteine können auch gezielt zum Abbau in Lysosomen transportiert werden: einige Proteine tragen auf ihrer Oberfläche bestimmte Signale, die sogenannten **KFERQ-Sequenzen**. (KFERQ steht für Lysin, Phenylalanin, Glutamat, Arginin und Glutamin). Diese Sequenzen bewirken, daß die sie tragenden Proteine selektiv an die Lysosomen geliefert werden. Möglicherweise befestigen die KFERQ-Sequenzen diese Proteine an Organelle im Cytoplasma, die demnächst autophagozytiert werden sollen und dabei die Proteine indirekt mit ins Lysosom bringen. Vielleicht gibt es aber auch ein spezifisches Transportsystem in der Lysosomenmembran, das diese Signale erkennt und die Proteine direkt durch die Membran schleust.

Der Transport vom Trans-Golgi hin zur Zelloberfläche bezeichnet man als **Exozytose**. Wir haben jetzt das Verdauungssystem im Zellinneren kennengelernt, ebenso die verschiedenen nach innen verlaufenden Wege des Membrantransports, die sich bei den Lysosomen treffen. Wir kehren nun kurz zum Golgi-Apparat zurück und untersuchen die **sekretorischen Wege**, die aus der Zelle hinausführen.

Normalerweise verlassen Transportvesikel, die für die Plasmamembran bestimmt sind, das trans-Golgi-Netz in ständiger Folge. Die in ihnen enthaltenen Membranproteine und -lipide sind neue Bausteine für die Plasmamembran der Zelle, während die löslichen Proteine an die Zellumgebung abgegeben werden. Die Fusion dieser Vesikel mit der Plasmamembran wird als Exozytose bezeichnet. Auf diese Weise produzieren und sezernieren die Zellen zum Beispiel die meisten **Proteoglykane** und **Glykoproteine** der extrazellulären Matrix.

Dieser **konstitutive Ausscheidungsweg** ist für alle Zellen unentbehrlich. Spezialisierte Zellen verfügen allerdings noch über einen weiteren Weg, in dessen Verlauf lösliche Proteine und andere Substanzen in sekretorischen Vesikeln für die spätere Freisetzung gespeichert werden. Diesen sogenannten **regulierten Ausscheidungsweg** findet man vor allem in Zellen, die sich auf die bei Nachfrage schnelle Abgabe ihrer Produkte - **Hormone**, **Neurotransmitter**, **Verdauungsenzyme**, **Histamine** - spezialisiert haben.

Die regulierte Ausscheidung von Proteinen kann prinzipiell über drei unterschiedliche Wege laufen, bevor sie das trans-Golgi-Netz verlassen: sie sind entweder für Lysosomen oder sekretorische Vesikel bestimmt, oder zur sofortigen Ausscheidung an der Zelloberfläche vorgesehen. Wie bereits erwähnt sind Proteine mit Zielort Lysosom mit einem „KFERQ-Etikett" für ihren Lysosomen-Import markiert. Ebenso werden Proteine für sekretorische Vesikel durch Signale gelenkt. Die meisten anderen Proteine, die unmittelbar zur Zelloberfläche gelangen sollen, werden über einen nicht-selektiven, offenen Transportweg befördert - Ausnahmen sind Proteine, die für ganz bestimmte Domänen der Zelloberfläche bestimmt sind.



065: Die Exozytose-Pathways: konstitutive und regulierte Exozytose

In Zellen, die bei Bedarf schnell einige ihrer Produkte ausscheiden, werden diese in den sekretorischen Vesikeln angereichert und gespeichert. Man bezeichnet diese Vesikel auch als **sekretorische Granula**. Sekretorische Vesikel schnüren sich unter Beteiligung von Clathrin vom trans-Golgi-Netz ab und geben als Antwort auf extrazelluläre Signale ihre Inhaltsstoffe durch Exozytose an die Umgebung der Zelle ab. Bei dem sezernierten Produkt kann es sich um ein kleines Molekül (z.B. Histamin) oder ein Protein (Hormone oder Verdauungsenzym) handeln.

Die für die sekretorischen Vesikel bestimmten Proteine (oftmals sekretorische Proteine genannt) müssen im trans-Golgi-Netz in die richtigen Vesikel verpackt werden. Dabei spielt wahrscheinlich die selektive Aggregation der sekretorischen Proteine eine Rolle; solche Aggregate erkennt man im Elektronenmikroskop als Klumpen von elektronendichtem Material im Lumen des trans-Golgi-Netzes. Das „Sortiersignal", das die Proteine in ein solches Aggregat steuert, kennt man allerdings nicht; vermutlich handelt es sich aber um einen Signalbereich,

der vielen sekretorischen Proteinen gemeinsam ist. Wenn man nämlich das Gen für ein sekretorisches Protein in eine andere Zelle bringt, die dieses Protein normalerweise nicht produziert, wird das fremde Protein auch dort korrekt in die sekretorischen Vesikel verpackt.

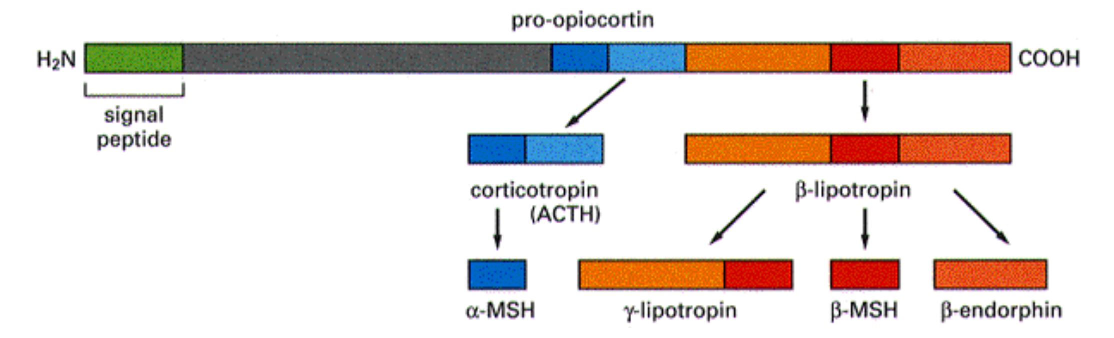
Unklar ist auch, wie die Aggregate aus sekretorischen Proteinen auf die sekretorischen Vesikel verteilt werden. Sekretorische Vesikel enthalten Membranproteine, die im trans-Golgi-Netz vielleicht als Rezeptoren für das aggregierte Material dienen. Die Verpackung der Aggregate in sekretorische Vesikel ähnelt wahrscheinlich stark der Aufnahme von Partikeln durch Phagozytose an der Zelloberfläche, bei der ebenfalls Clathrin-bedeckte Membranen eine Rolle spielen. Wenn sich die unreifen sekretorischen Vesikel vom trans-Golgi-Netz abgeschnürt haben, wird die Clathrinhülle entfernt, und der Vesikel-Inhalt kondensiert sehr stark - bis zum 200-fachen seiner Konzentration im Golgi-Apparat. Diese Kondensation tritt sehr plötzlich auf und wird vermutlich durch eine Ansäuerung des Vesikel-Lumens hervorgerufen, die durch ATP-getriebene H^+-Pumpen in der Vesikel-Membran zustandekommt. Die reifen Vesikel sind so prall gefüllt, daß eine sekretorische Zelle bei entsprechender Reizung schnell große Substanzmengen durch Exozytose sezernieren kann.



066: Sekretion von Vesikeln durch Exozytose

Wenn sekretorische Vesikel reifen, unterliegen die sekretorischen Proteine nicht nur der Kondensation. Viele Polypeptidhormone und Neuropeptide, aber auch sezernierte hydrolysierende Enzyme entstehen als **inaktive Proteinvorläufer**, aus denen die aktiven Moleküle erst **durch Proteolyse** freigelegt werden müssen. Diese Spaltungen beginnen vermutlich im trans-Golgi-Netz und gehen in den sekretorischen Vesikeln weiter, manchmal sogar in der extrazellulären Flüssigkeit nach der Ausscheidung. Viele ausgeschiedene Polypeptide besitzen deshalb am Amino-terminalen Ende ein **Pro-Peptid**; dieses wird kurz vor der Sekretion abgeschnitten, es entsteht das reife Protein.

In anderen Fällen werden Signalpeptid-Moleküle als **Polyproteine** gebildet, die viele Kopien derselben Aminosäure-Sequenz enthalten. Noch komplizierter wird es, wenn unterschiedliche Signalpeptid-Moleküle als Teil eines **Polyproteins** synthetisiert werden; es stellt den Vorläufer für viele Endprodukte dar, die einzeln von der ursprünglichen Polypeptidkette abgespalten werden:



067: Beispiel eines Polyproteins: Pro-Opiocortin und seine Hydrolyseprodukte

Warum ist die proteolytische Weiterverarbeitung auf dem Ausscheidungswege so verbreitet? Manche Proteine, die auf diese Weise entstehen, z.B. die **Enkephaline** (Neuropeptide aus fünf Aminosäuren mit Morphin-ähnlicher Wirkung) sind zweifellos in ihren reifen Formen zu kurz, um während der Translation ins ER-Lumen transportiert zu werden; oder ihnen fehlen die Signale, die für die Verpackung in sekretorische Vesikel erforderlich sind. Bei ausgeschiedenen hydrolysierenden Enzymen und jedem anderen Protein, dessen Aktivität in seiner Ursprungszelle schädlich wäre, hat die verspätete Aktivierung des Pro-

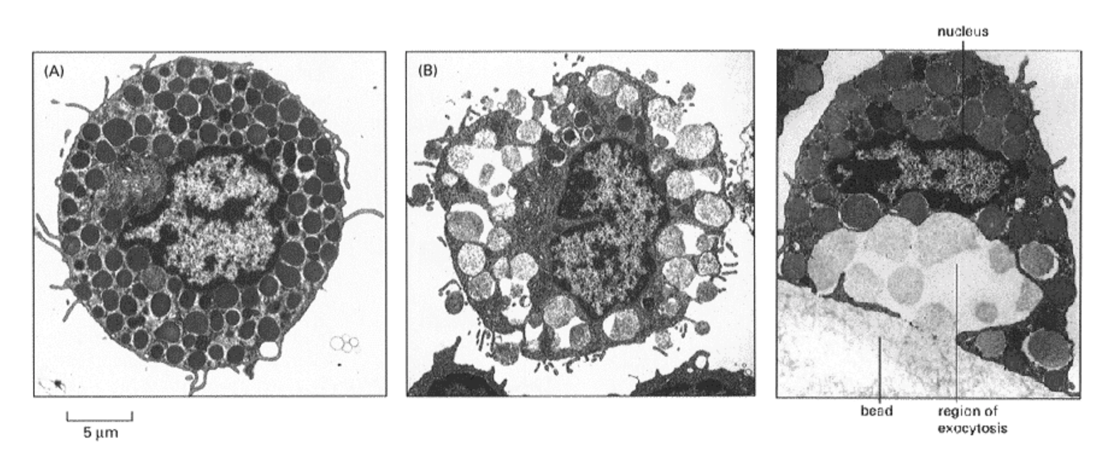
teins einen klaren Vorteil: sie findet erst im sekretorischen Vesikel oder nach der Ausscheidung statt.

Wenn ein sekretorisches Vesikel beladen worden ist, muß es an den Ort der Ausscheidung gelangen und dort warten, bis die Zelle das Signal zur Sekretion erhält. In manchen Zellen sind diese Stellen weit vom Golgi-Apparat entfernt, Nervenzellen liefern dazu das extremste Beispiel. Sekretorische Proteine wie z.B. Peptid-Neurotransmitter, die am Ende des Axons freigesetzt werden sollen, werden im Zellkörper-dort liegen Ribosomen, ER und Golgi-Apparat - hergestellt und in Vesikel verpackt. Sie müssen dann am Axon entlang zu dessen Ende wandern und legen dabei unter Umständen Entfernungen von einem Meter und mehr zurück.

Der letzte Schritt auf dem gesteuerten Ausscheidungsweg ist die auf einen Reiz hin erfolgende Freisetzung des Produkts durch Exozytose. Das Signal zur Sekretion ist häufig ein chemischer Botenstoff, wie z.B. ein Hormon, der an Rezeptoren auf der Zelloberfläche bindet (siehe auch extrazelluläre Kommunikation). Die daraus folgende Aktivierung der Rezeptoren erzeugt intrazelluläre Signale, was häufig mit einem vorübergehenden Anstieg der Konzentration von freiem Ca^{2+} im Cytoplasma einhergeht. Beim Axon eines Nerven ist das Signal für die Exozytose gewöhnlich eine elektrische Erregung (Aktionspotential), das selbst wiederum durch die Bindung eines chemischen Transmitters an Rezeptoren irgendwo anders auf der Zelloberfläche ausgelöst wurde. Das Aktionspotential verursacht ein Einströmen von Ca^{2+} in das Axonende durch spannungsgesteuerte Ca^{2+}-Kanäle. Der plötzliche Ca^{2+}-Fluß oder irgendein anderes intrazelluläres Signal in der sekretorischen Zelle löst über einen noch unbekannten Mechanismus die Exozytose aus: die sekretorischen Vesikel verschmelzen mit der Plasmamembran und geben ihre Inhaltsstoffe an den extrazellulären Raum ab.

Histamin ist ein kleines Molekül, das von Mastzellen auf dem regulierten Weg ausgeschieden wird, wenn spezifische Liganden an Rezeptoren auf ihrer Oberfläche binden. Es ist für einen Großteil der unangenehmen Symptome - z.B. Juckreiz und Niesen - bei allergischen Reaktionen verantwortlich. Inkubiert man Mastzellen in einer Flüssigkeit, in der ein solches Stimulans gelöst ist, findet die Exozytose auf der

gesamten Zelloberfläche statt. Allerdings reagiert nicht die gesamte Mastzelle auf den Reiz. Bindet man nämlich die stimulierende Substanz künstlich an eine feste Unterlage, so daß sie nur mit einem bestimmten Abschnitt der Mastzell-Oberfläche in Wechselwirkung treten kann, ist die Exozytose auf diesen Kontaktbereich zwischen Mastzelle und Unterlage beschränkt. Offensichtlich können die einzelnen Bereiche der Plasmamembran unabhängig voneinander arbeiten. Das Ergebnis ist, daß die Mastzelle - anders als eine Nervenzelle - bei Erregung nicht als Ganzes reagiert. Rezeptor-Aktivierung, die folgenden intrazellulären Signale und die anschließende Exozytose finden alle in dem bestimmten Bereich der Zelle statt, der gereizt wurde.



068: Mastzellen der Ratte (A). Histaminausschüttung nach Reizung der Zellen (B) durch einen löslichen Liganden, bzw. durch Kontakt mit einer "Liganden-besetzten" Oberfläche.

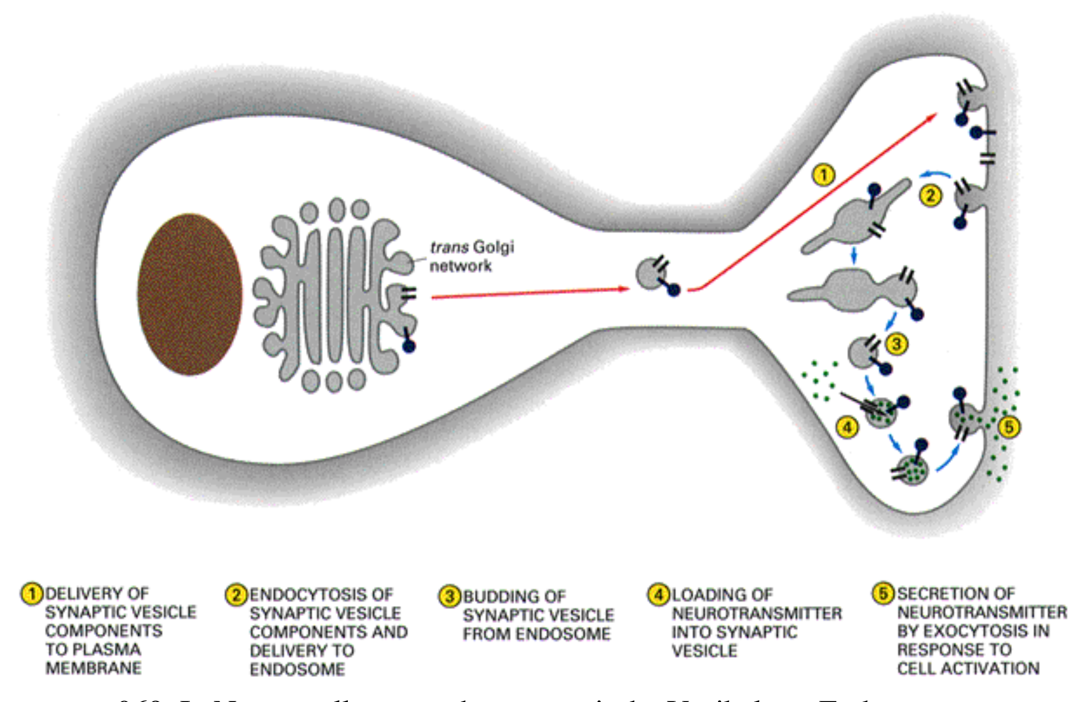
Wenn eine sekretorische Vesikel mit der Plasmamembran verschmilzt, wird ihr Inhalt durch Exozytose aus der Zelle freigesetzt, und ihre Membran wird zu einem Teil der Plasmamembran. Das sollte eigentlich die Oberfläche stark vergrößern, was aber nur vorübergehend der Fall ist. Die Membranbestandteile werden nämlich durch Endozytose wieder von der Zelloberfläche entfernt, und zwar fast ebenso schnell, wie sie durch die Exozytose dorthin gelangen. So werden die Proteine aus der Membran der sekretorischen Vesikel wieder zum trans-Golgi-Netz zurückbefördert (möglicherweise über Endosomen), wo sie erneut verwendet werden können.

Dieses Recycling führt dazu, daß sich die Verteilung der Membranbestandteile zwischen den einzelnen Zellkompartimenten in einem Fließgleichgewicht befindet. Die Menge an Membran aus sekretorischen Vesikeln, die vorübergehend in die Plasmamembran eingebaut wird, kann ungeheuer groß sein: in die **apikale** Plasmamembran einer **Acinus-Zelle des Pankreas** (sezerniert Verdauungsenzyme nach Reizung) werden in relativ kurzer Zeit rund 900 μm^2 Vesikelmembran eingefügt, obwohl dieser Bereich selbst nur eine Fläche von 30 μm^2 einnimmt.

Nervenzellen (und einige endokrine Zellen) enthalten zwei Sorten von sekretorischen Vesikeln. Proteine und Peptide werden üblicherweise in sekretorische Vesikel mit dichtem Kern verpackt. Zusätzlich ist jedoch noch eine andere spezialisierte Gruppe von kleinen sekretorischen Vesikeln (Durchmesser rund 50 nm) im Gebrauch, die ganz anders entstehen. Diese sogenannten **synaptischen Vesikel** speichern die kleinen Neurotransmitter-Moleküle - wie **Acetylcholin**, **Glutamat** und **γ-Aminobuttersäure** (GABA) - die an chemischen Synapsen für eine schnelle Signalübertragung von Zelle zu Zelle sorgen.

Wenn ein Aktionspotential ein Nervenende erreicht, schütten die Vesikel ihre Inhaltsstoffe innerhalb eines Bruchteils einer Millisekunde aus. Manche Neurone feuern mehr als l000-mal pro Sekunde, wobei jedesmal synaptische Vesikel frei werden. Der Vesikelvorrat muß also sehr schnell wieder aufgefüllt werden; das geschieht vermutlich nicht von der Golgi-Membran aus, sondern über eine örtliche Wiederverwendung von Plasmamembranen, was im folgenden beschrieben werden soll. Man ist der Ansicht, daß die Membranbausteine der synaptischen Vesikel anfangs über den konstitutiven Ausscheidungsweg zur Plasmamembran gebracht werden. Sie sollen dann durch Exozytose wieder entfernt und zu den Endosomen befördert werden, von wo sie erneut aggregieren und sich als synaptische Vesikel abschnüren. Zu den Komponenten der Vesikelmembran gehören auch Trägerproteine, die sich auf die Aufnahme von Neurotransmittern aus dem Cytoplasma, wo diese synthetisiert werden, spezialisiert haben. Mit Neurotransmittern gefüllte Vesikel gehen zur Plasmamembran zurück und warten dort auf die Reizung der Zelle. Nach der Abgabe des Inhalts werden die Membrananteile der Vesikel auf dieselbe Weise wieder aufge-

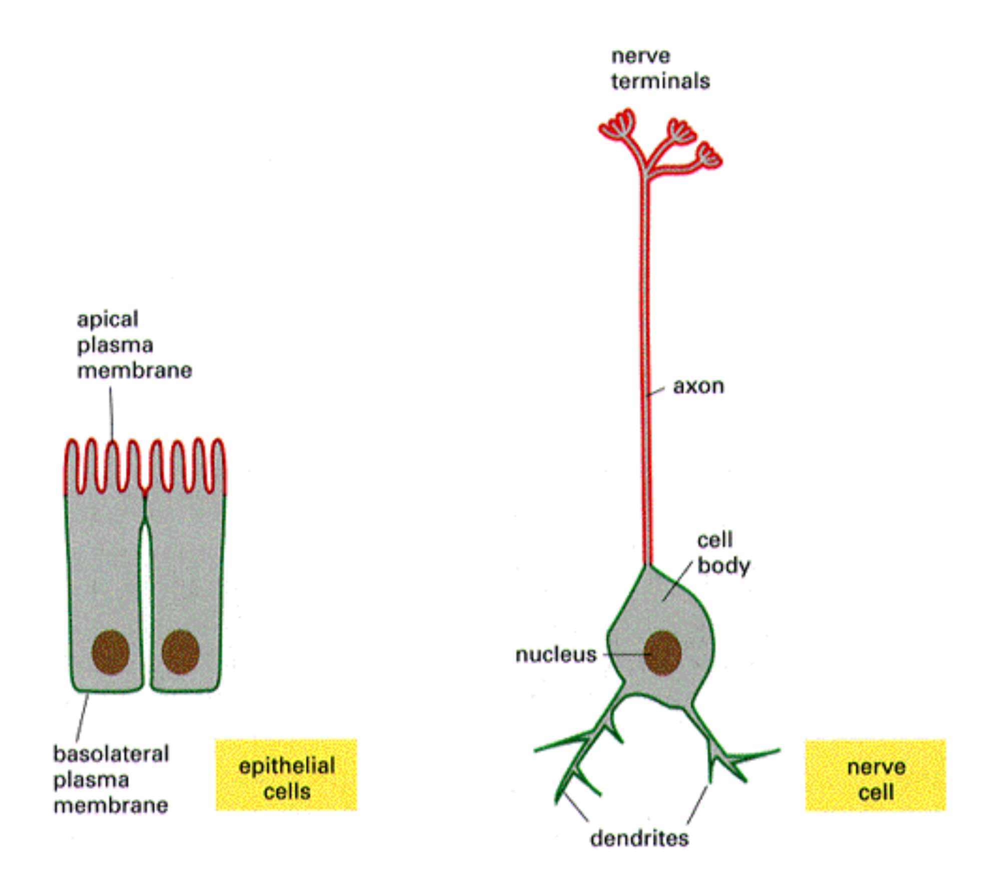
nommen und erneut eingesetzt. Durch Zugabe eines Indikatormoleküls, z.B. Peroxidase, zum umgebenden Medium, kann man den ganzen Zyklus von der Endo- zur Exozytose beobachten: das Molekül wird zunächst in die Endosomen aufgenommen und taucht dann in synaptischen Vesikeln wieder an der Zelloberfläche auf.



069: In Nervenzellen entstehen synaptische Vesikel aus Endosomen

Die meisten Zellen **in Geweben** sind polar: ihre Plasmamembran enthält zwei (und manchmal mehr) abgegrenzte Domänen und verschiedene Sorten sekretorischer Vesikel müssen gezielt dorthin gebracht werden. Damit ergibt sich ein allgemeines Problem: wie kann die Membranzustellung aus dem Golgi-Apparat so organisiert werden, daß die Unterschiede zwischen den Domänen der Zelloberfläche erhalten bleiben? Eine typische Epithelzelle zum Beispiel verfügt über eine apikale Domäne, die zum Lumen gerichtet ist und oft spezielle Merkmale, z.B. Cilien oder borstenartig ausgestülpte Mikrovilli, besitzt. Der Rest der Zelle bildet die basolateralen Domäne. Die beiden Domänen sind durch einen Ring von “Tight Junctions” getrennt. Diese spezialisierten Zell/ZellVerbindungen hindern Proteine und Lipide in der äußeren Lage der Lipid-Doppelschicht daran, zwischen den Membran-Domänen hin- und herzudiffundieren. Daher ist nicht nur die Proteinausstattung,

sondern auch die Lipidzusammensetzung der beiden Membran-Domänen unterschiedlich. Besonders die apikale Membrandomäne ist reich an Glykolipiden; sie dienen dieser exponierten Oberfläche als Schutzschild gegen Beschädigungen durch Verdauungsenzyme und den hohen pH-Wert, der im Darmlumen vorkommen.



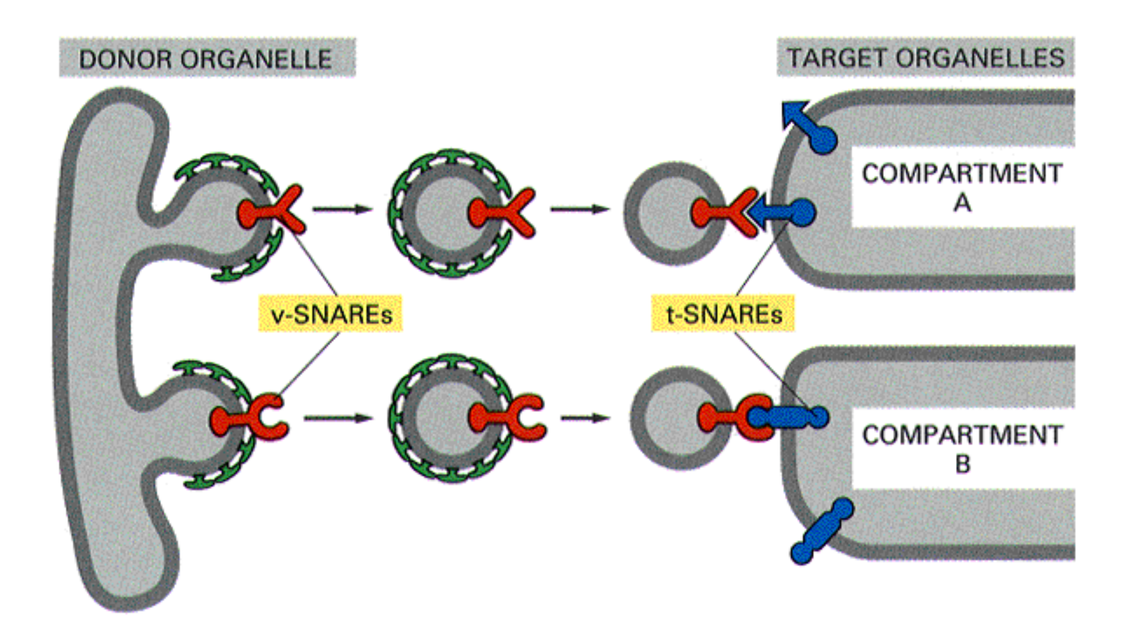
070: Vergleich zweier Typen von polaren Zellen

Der Transport von Proteinen in apikale oder basolaterale Membranteile wird spezifisch gelenkt. **Epithelzellen** sezernieren eine Produktgruppe an der apikalen Oberfläche - bei den Zellen der Darmauskleidung sind es **Verdauungsenzyme** und **Schleim** - und eine andere Produktgruppe an ihrer basolateralen Oberfläche - z.B. **Laminin** und andere **Komponenten der Basallamina**. Solche Zellen müssen also Vesikel mit unterschiedlicher Fracht zu verschiedenen Domänen der Plasmamembran lenken. Dazu werden Proteine, die für unterschiedliche Domänen bestimmt sind, gemeinsam vom ER zum trans-Golgi Netz transportiert. Hier werden sie getrennt und auf sekretorische oder Transportvesikel verteilt, die zu der jeweiligen Membrandomäne wandern.

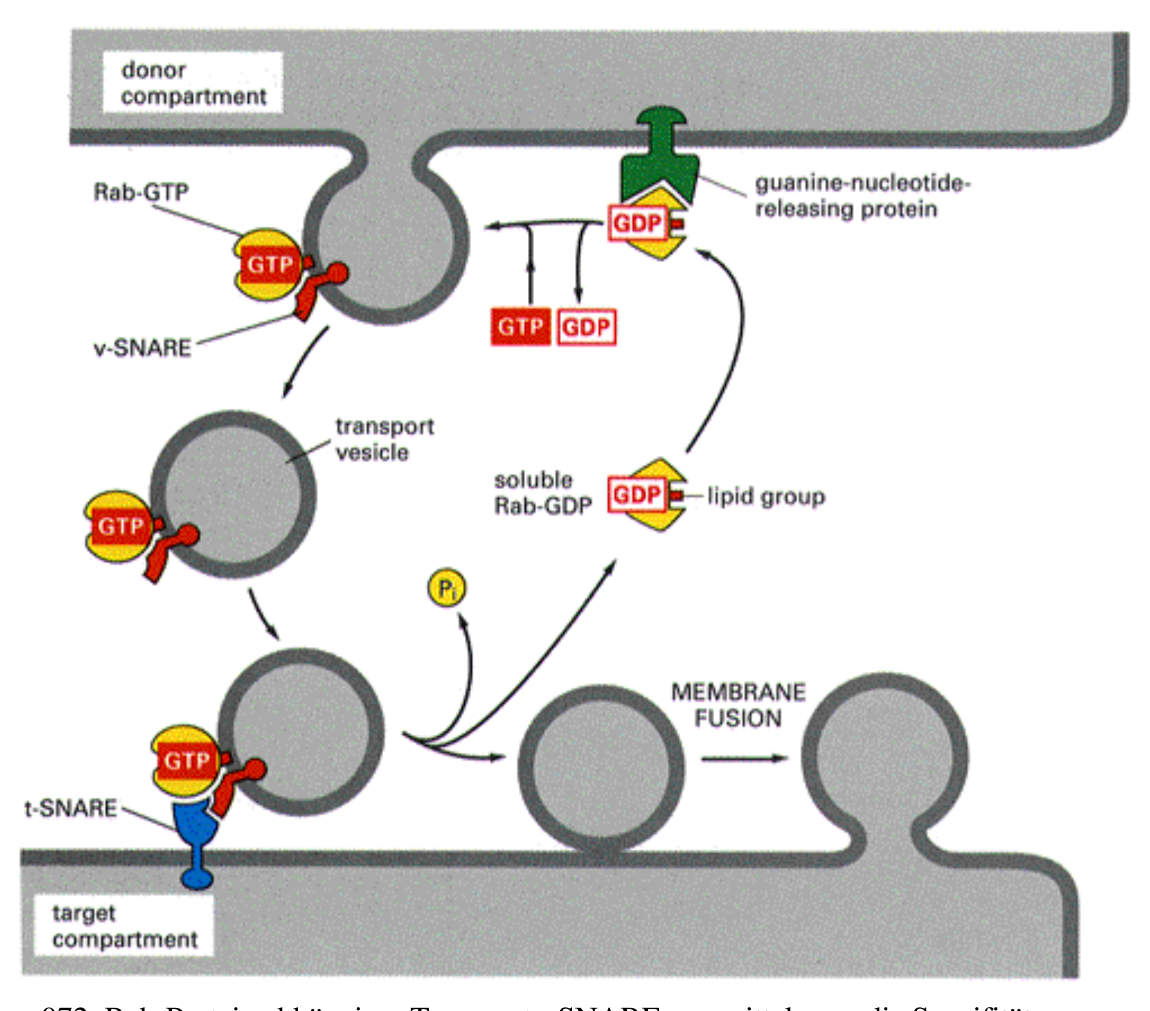
Im letzten Teil dieses Abschnitts müssen wir uns nun den Mechanismen zuwenden, die alle diese Vesikel-Transportvorgänge so spezifisch ablaufen lassen. Diese Mechanismen wurden erst vor kurzer Zeit aufgeklärt. Wie bereits angesprochen, müssen alle Vesikel und ihre Zielorganelle entsprechende Markierungen tragen, damit die Transportvorgänge "adressiert" ablaufen. Wie dies im einzelnen geschieht, wird im Folgenden besprochen.

Alle Zellen besitzen Familien regulatorisch aktiver, GTP-bindender Proteine. Diese Proteine arbeiten als **molekulare Schalter**, die schnell zwischen zwei Konformationszuständen wechseln können - einem aktiven, geladenen Zustand mit gebundenem **GTP** und einem inaktiven, ungeladenen Zustand mit **GDP** -, und sie wirken als Regulatoren vieler komplizierter zellulärer Vorgänge (siehe auch intrazelluläre Kommunikation). GTP-bindende Proteine arbeiten in einem Zyklus, der typischerweise von zwei Hilfskomponenten abhängt: einem **Guanin-Nukleotid-freisetzenden Protein** (GNRP), um den Austausch von GDP gegen GTP zu katalysieren und einem **GTPase-aktivierenden Protein** (GAP), um die Hydrolyse des gebundenen GTP auszulösen. Viele dieser regulatorischen GTP-bindenden Proteine besitzen eine kovalent angehängte Lipidgruppe, die sie bei der Bindung an Membranen unterstützt; und sie sind an einer Vielzahl Membran-abhängiger Aktionen in der Zelle beteiligt. Solche monomeren, GTP-bindenden Proteine, sogenannte **Rab-Proteine**, sind essentiell am Vesikeltransport beteiligt.

Alle Transportvesikel in einer Zelle verfügen über spezifische Oberflächenmarkierungen, an denen ihre Herkunft und Fracht identifiziert werden kann, und die von komplementären Rezeptoren in der richtigen Zielmembran erkannt werden. Dazu gibt es die als **SNAREs** benannten Proteine: **v-SNAREs** auf der **V**esikelmembran und **t-SNAREs** auf der Ziel(**t**arget)membran. SNAREs aus Nervenzellen sind am besten charakterisiert; sie vermitteln dort das Andocken der synaptischen Vesikel an die Plasmamembran der Nervenenden in Vorbereitung auf die Exozytose.



071: Das v-Snare•t-Snare Modell des Vesikeltransports



072: Rab-Protein abhängiger Transport - SNAREs vermitteln nur die Spezifität

Eine Vesikel inspiziert wahrscheinlich viele mögliche Zielmembranen, bevor sein spezifisches **v-SNARE** ein komplementäres **t-SNARE** findet. Dieser wichtige Erkennungsschritt wird von monomeren GTPasen, den sogenannten **Rab-Proteinen**, kontrolliert, die überprüfen, ob ein v-SNARE und ein t-SNARE richtig zueinander passen. Die Rab-Proteine werden in der Donator-Membran an die Oberfläche der knospenden Coated Vesicle angeheftet. Trifft ein Vesikel die richtige Zielmembran, kann die Bindung von v-SNARE an t-SNARE das Vesikel lange genug festhalten, damit das Rab-Protein sein gebundenes GTP hydrolysieren kann, wodurch die Vesikel an die Zielmembran gekettet und für die folgende Fusion vorbereitet sind.

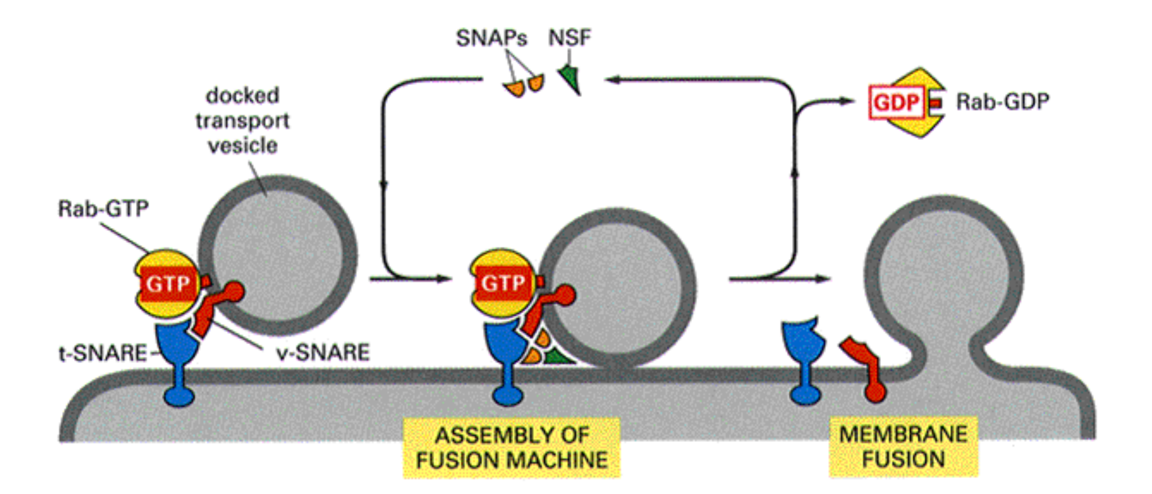
Eukaryontenzellen enthalten viele verschiedene Rab-Proteine (siehe Tabelle). Jedes ist mit einem besonderen, Membran-begrenzten Organell assoziiert, das an den sekretorischen oder endozytotischen Ausscheidungswegen beteiligt ist. Jedes dieser Organelle besitzt auf der dem Cytoplasma zugewandten Oberfläche mindestens ein Rab-Protein. Das erste Rab-Protein (Sec4) fand man in Hefe, als man nach Mutationen suchte, die die Sekretion stören (SEC-Mutationen). Es stellte sich dann heraus, daß es ein Bestandteil sekretorischer Vesikel ist und für deren Anlegen an die Plasmamembran benötigt wird. Mutationen, die das Protein zerstören, verhindern, daß sekretorische Vesikel ihren Inhalt an die Außenwelt abgeben. Die Unterschiede in den Aminosäure-Sequenzen der Rab-Proteine sind in der Nähe der Carboxy-Enden am größten. Mit Hilfe der Gentechnik durchgeführte Experimente deuten an, daß es die Carboxy-Enden der Rab-Proteine sind, die eine intrazelluläre Position für jedes Familienmitglied festlegt; vermutlich ermöglicht er den Proteinen, an einen komplementären Guanin-Nucleotid-Freisetzungsfaktor auf der Oberfläche eines bestimmten Organells zu binden. Bevor die SNAREs zu Kandidaten für die Organellen-Markierungsproteine erkoren wurden, glaubte man, daß die Rab-Proteine - wegen ihrer Organell-spezifischen Verteilung - diese Rolle spielen würden. Jetzt weiß man allerdings, daß zumindest einige Rab-Proteine funktionell gegeneinander austauschbar sind, solange experimentell dafür gesorgt wird, daß sie in das neue Organell gelangen. Daher konnten sie nicht die Erklärung für die Selektivität des Vesikeltransports sein.

Protein	**Organell**	**Organismus**
Rabl (YPT1)	ER und Golgi-Komplex	Hefe
Rab2	ER-Ubergangselemente, cis-Golgi-Netz	Säuger
Rab3A	sekretorische Vesikel	Säuger
Rab4	frühe Endosomen	Säuger
RabS	frühe Endosomen, Plasmamembran	Säuger
Rab6	medial- und trans-Golgi-Zisternen	Säuger
Rab7	späte Endosomen	Säuger
Rab9	späte Endosomen, trans-Golgi-Netz	Säuger
Sec4	sekretorische Vesikel	Hefe

Bisher bekannte Rab-Proteine und ihre intrazelluläre Lokalisation

Wenn eine Transportvesikel einmal ihre Zielmembran erkannt und dort angelegt hat, muß sie ihre Fracht durch Membranverschmelzung entladen. Die Fusion der Membranen folgt jedoch nicht immer unmittelbar. Bei der regulierten Exozytose findet solange keine Fusion statt, bis sie durch ein extrazelluläres Signal ausgelöst wird.

Anlegen und **Fusion** sind deshalb zwei verschiedene und voneinander trennbare Prozesse. Man kann z.B. die Fusion verhindern, indem man die **Ca^{2+}-Konzentration** im Cytoplasma niedrig hält. Das Ergebnis ist eine Anhäufung von Vesikeln an, aber keine Verschmelzung mit der Zielmembran. Für das **Andocken** reicht es, daß sich die zwei Membranen so nahe kommen, daß von der Lipid-Doppelschicht abstehende Proteine in Wechselwirkung treten und aneinander haften können. Die **Fusion** erfordert eine viel stärkere Annäherung (ca.1,5 nm), so daß sie sich verbinden können. Dazu muß Wasser von der hydrophilen Membranoberfläche verdrängt werden - ein Vorgang, der energetisch äußerst ungünstig ist. Zwei bekannte Proteinkomponenten, **NSF** und **SNAPs**, ermöglichen diesen Vorgang, indem sie zwischen den zu verschmelzenden Membranen binden. Sie binden an v-SNARE auf der Vesikelmembran und an t-SNARE auf der Zielmembran, um den Zusammenbau des Fusionsapparats einzuleiten, der die Verschmelzung der beiden Lipid-Doppelschichten an der Vesikel-Zielmembran-Grenzfläche katalysiert.



073: Nachdem SNAPs (soluble NSF attachment proteins) an die beiden SNAREs gebunden hat, kann NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) binden. Unter Zuhilfenahme von Acetyl-CoA und weiteren bisher nicht bekannten Proteinen wird die Membranverschmelzung eingeleitet. NSF ist eine ATPase; diese katalytische Aktivität ermöglicht die Auflösung des gesamten Komplexes am Ende der Reaktion.

• *Strukturgebende Komponenten*

DAS CYTOSKELETT

Die Fähigkeit der Eukaryontenzellen, verschiedene Formen anzunehmen und koordinierte, gerichtete Bewegungen auszuführen, beruht auf dem **Cytoskelett**, einem komplexen Geflecht aus Proteinfilamenten, das sich durch das ganze Cytoplasma erstreckt. Im Gegensatz zu einem Skelett aus Knochen ist das Cytoskelett aber eine höchst **dynamische Struktur**, die sich ständig neu organisiert, wenn die Zelle ihre Form verändert, sich teilt und auf ihre Umgebung reagiert. Eigentlich könnte man das Cytoskelett ebensogut als „**Cytomuskulatur**" bezeichnen, denn es ist unmittelbar verantwortlich für **Bewegungsvorgänge** wie das Kriechen der Zellen auf einer Unterlage, die **Muskelkontraktion** und die vielen **Formveränderungen** während der Entwicklung eines Wirbeltierembryos. Außerdem stellt es die Maschinerie bereit, die innerhalb der Zelle für **Bewegung** sorgt und unter anderem die **Organellen** im Cytoplasma von einer Stelle zur anderen transportiert und in der **Mitose** die Chromosomen trennt.

Die vielfältigen Aktivitäten des Cytoskeletts hängen von drei Haupttypen von Proteinfilamenten ab: den **Actin-Filamenten**, den **Mikrotubuli** und den **Intermediärfilamenten**. Jeder Filamenttyp setzt sich aus anderen Protein-Monomeren zusammen: **Actin** bildet die Actin-Filamente, **Tubulin** baut die Mikrotubuli auf, und eine Familie verwandter fibrillärer Proteine, darunter **Vimentin und Lamin**, liefert die Bausteine für die Intermediärfilamente.

Actin und Tubulin sind in der Evolution der Eukaryonten besonders stabil geblieben; ihre Proteinfilamente binden vielfältige **Zubehör-Proteine**, die das gleiche Filament in die Lage versetzen, in einzelnen Bereichen der Zelle **verschiedene Funktionen** zu erfüllen: (1) verkoppeln von Filamenten; (2) verkoppeln von Filamenten mit anderen Zellbestandteilen; (3) Steuerung der Geschwindigkeit und Ausmaß der Polymerisation; (4) Zusammenbau von Actin-Filamenten und Mikrotubuli; (5) Bewegungsproteine, die ATP hydrolysieren und dabei Kraft und gerichtete Bewegung entlang dem Filament erzeugen.

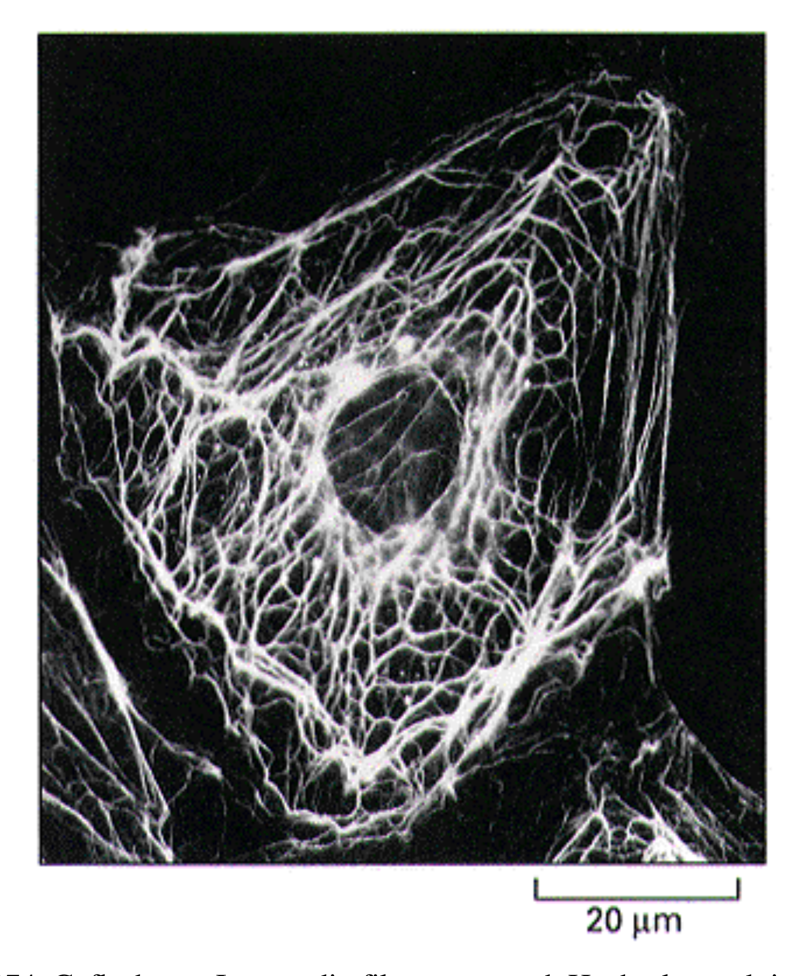
Wie kann eine Eukaryontenzelle mit einem Durchmesser von 10 μm oder mehr ihre Raumaufteilung durch die Moleküle des Cytoskeletts erhalten, die im typischen Fall in ihrer linearen Ausdehnung etwa 2000-mal kleiner sind? Die Antwort heißt: durch **Polymerisation**. Bei jedem der drei Haupttypen von Cytoskelettproteinen lagern sich Tausende identischer Moleküle zu gestreckten Filamenten zusammen, die bei Bedarf so lang werden können, daß sie von einem Ende der Zelle zum anderen reichen. Solche Filamente verbinden Proteinkomplexe und Organellen in den verschiedenen Bereichen der Zelle und dienen als „Schienen" für den Transport zwischen ihnen.

Jedes Filamentprotein ist mit einem orientierten Paar komplementärer Bindungsstellen für Moleküle seines eigenen Typs ausgestattet, und kann ein langes, helikales Filament bilden. Bei allen drei Grundtypen der Proteinfilamente, die das Cytoskelett bilden, handelt es sich um helikale Polymere, die aber in der Zelle unterschiedlich verteilt sind und jeweils eigene Funktionen erfüllen. Die drei Filamenttypen allein könnten der Zelle jedoch weder Form noch Festigkeit verleihen. Sie sind mit ihrer Funktion auf sog. **Zubehör-Proteine** angewiesen, welche die Filamente untereinander und mit anderen Zellbestandteilen verbinden.

INTERMEDIARFILAMENTE

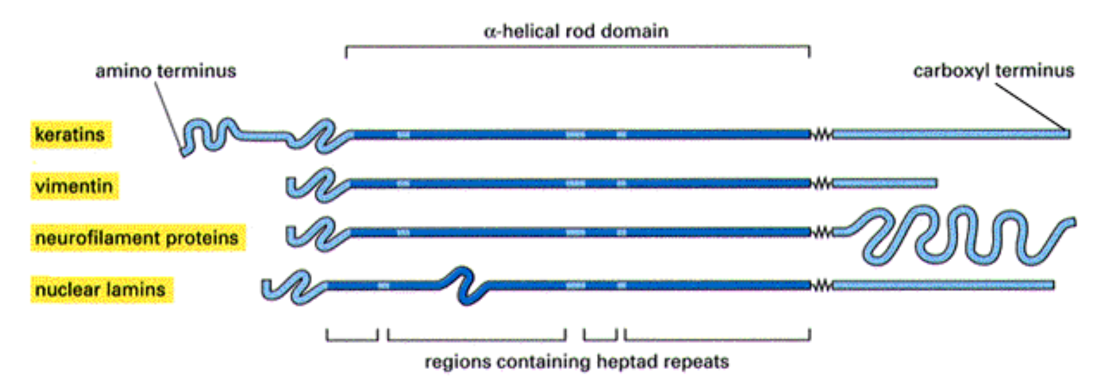
Intermediärfilamente sind widerstandsfähige, langlebige Proteinfasern, die sich bei den meisten Zellen im Cytoplasma befinden. Ihr erkennbarer Durchmesser von 8 bis 10 nm liegt zwischen dem der Actin-Filamente und dem der dicken Myosin-Filamente. In den meisten Zellen ist der Zellkern von einem umfangreichen Geflecht aus Intermediärfilamenten umgeben, das sich nach außen bis zur Zellperipherie erstreckt und mit der Plasmamembran in Wechselwirkung steht. Das dicht verwobene Netz aus Intermediärfilamenten der Kernhülle bezeichnet man als **Kernlamina**.

Besonders gut ausgebildet sind die Intermediärfilamente im Cytoplasma von Zellen, die mechanischen Belastungen ausgesetzt sind. In großer Zahl findet man sie z.B. in Epithelien, wo sie sich über spezielle Verbindungen von Zelle zu Zelle erstrecken, sowie entlang der Axone von Nervenzellen und in allen Arten von Muskelzellen.



074: Geflecht aus Intermediärfilamenten nach Hochsalzextraktion

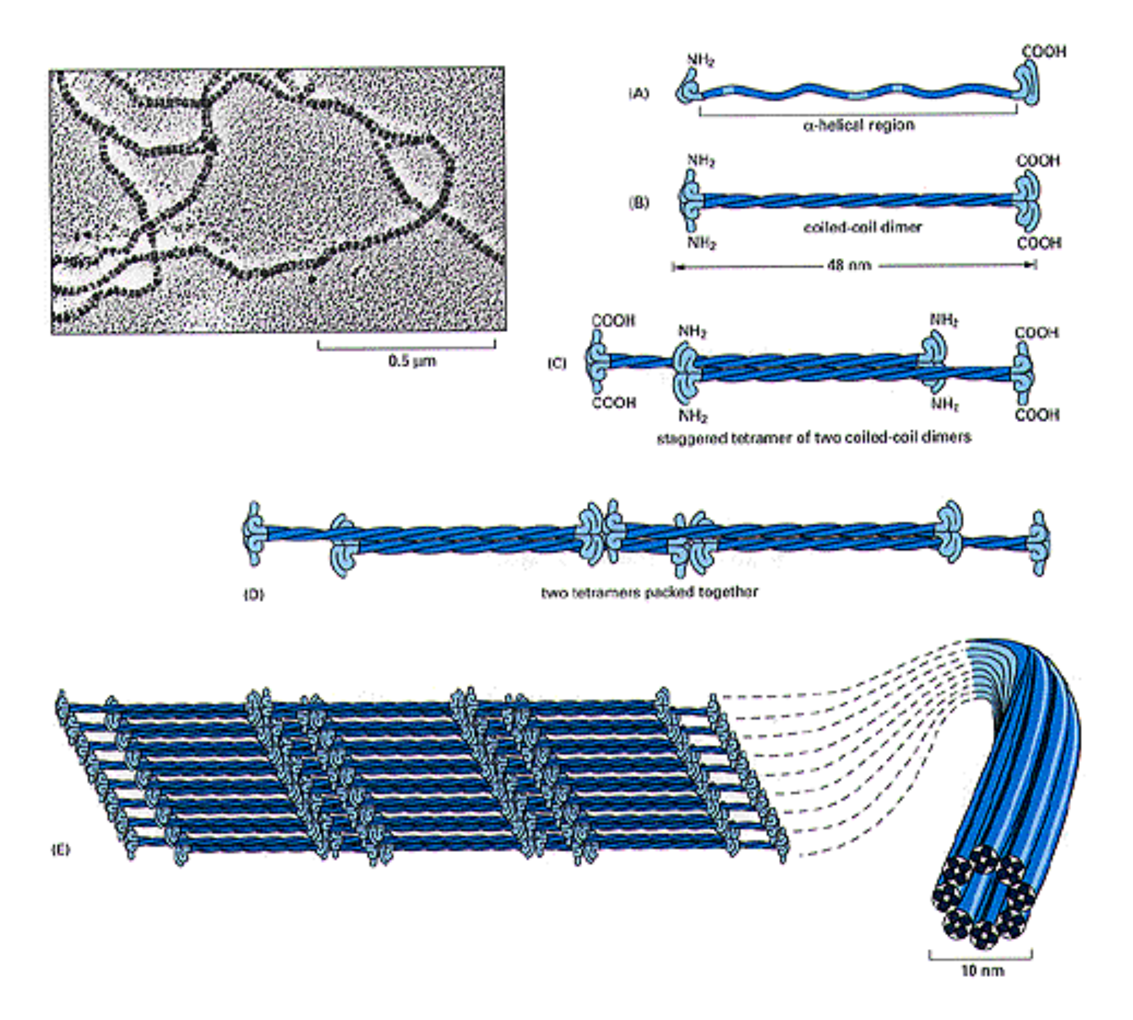
Anders als die globulären Proteine Actin und Tubulin sind die vielen verschiedenen Proteinmonomere der Intermediärfilamente lange Fasermoleküle mit einem **aminoterminalen Kopf**, einem **carboxyterminalen Schwanz** und einer **stabarmigen Domäne in der Mitte**. Die zentrale stäbchenförmige Domäne besteht aus einer langgestreckten α-Helix mit langen Tandem-Wiederholungen eines ganz bestimmten Aminosäure-Sequenzmotivs, das man als Heptaden(Siebener)-Wiederholung bezeichnet. Dieses Motiv aus sieben Aminosäuren fördert die Bildung von Doppelwendel-Dimeren aus zwei parallel verlaufenden alpha-Helices.



075: Beispiele für einige Proteine, die Intermediärfilamente ausbilden

Im nächsten Stadium der Zusammenlagerung heften sich zwei Doppelwendel-Dimere antiparallel zu einer Tetramer-Untereinheit aneinander. Die antiparallele Anordnung der Dimere läßt vermuten, daß die Tetramere und damit auch die aus ihnen gebildeten Intermediärfilamente unpolare Strukturen sind, d.h. sie sehen an beiden Enden gleich aus und sind auf ihrer ganzen Länge symmetrisch gebaut. In dieser Hinsicht unterscheiden sich die Intermediärfilamente von Mikrotubuli und Actin-Filamenten, denn diese sind polar, und ihre Funktion hängt von der Polarität ab. Im letzten Stadium lagern sich die Tetramere in einer einfachen Bindungsreaktion zu dem langen Intermediärfilament zusammen; sie liegen entlang der Längsachse zusammen und verbinden sich zu einer schraubenförmigen Struktur.

Die mittlere, stabförmige Domäne hat in allen Proteinen der Intermediärfilamente eine ähnliche Struktur und sorgt im fertigen Filament für die seitlichen Wechselwirkungen. Die kugelförmigen Kopf- und Schwanzdomänen dagegen können sich in Größe und Aminosäure-Sequenz stark unterscheiden, ohne daß dies die Grundstruktur des Filaments beeinträchtigt; sie ragen oft aus der Oberfläche des Filaments heraus und vermitteln Wechselwirkungen mit anderen Zellbestandteilen. Wegen dieses Strukturprinzips können die Intermediärfilamente aus Proteinen von erstaunlich unterschiedlicher Größe bestehen: das Spektrum reicht ungefähr von 40 bis 200 KDa.



076: Geordneter Zusammenbau von Intermediärfibrillen

Eine Zelle steuert den Zusammenbau der Intermediärfilamente und kann ihre **Zahl**, **Länge** und **Lage** festlegen. Ein solcher Regulationsmechanismus wird durch die **Phosphorylierung spezifischer Serin-Reste** in der aminoterminalen Kopfdomäne der Intermediärfilament-Proteine erwirkt (siehe auch Kernlamina: Lamine werden in der Mitose phosphoryliert und zerfallen dadurch völlig; nach Abschluß der Mitose werden die betreffenden Serin-Reste dephosphoryliert, und die Kernlamina bildet sich wieder). Auch die Intermediärfilamente im Cytoplasma können während der Mitose oder auch als Reaktion auf äußere Signale eine grundlegende Umstrukturierung durchmachen und sind von einer stärkeren Phosphorylierung der Untereinheiten begleitet.

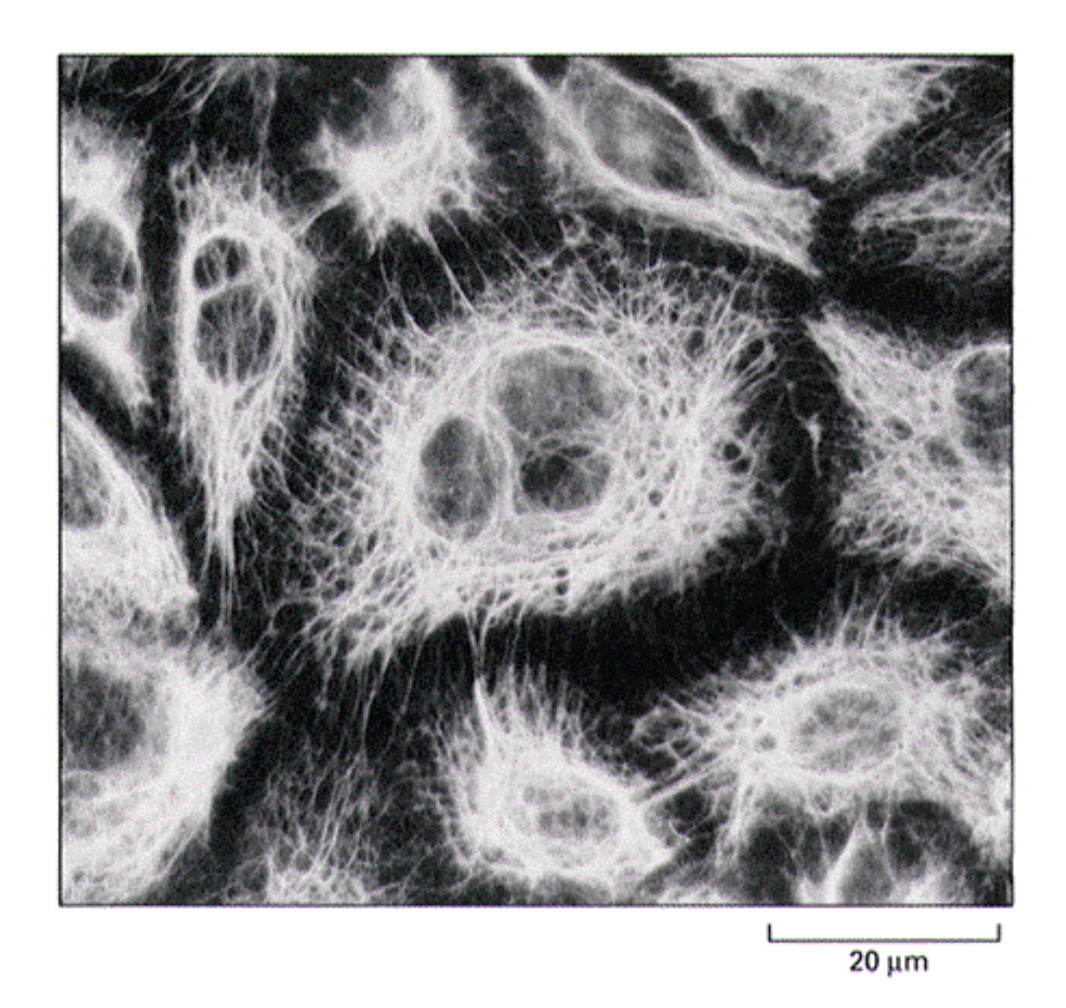
Anhand der Aminosäure-Sequenz kann man zwei Typen von Keratinen unterscheiden: die sauren Keratine des Typs I und die neutral/basischen Keratine des Typs II. Nur Heterodimere aus Keratinen der Typen I und II können sich zu Intermediärfilamenten zusammenlagern; Homodimere sind dazu nicht in der Lage, und das erklärt, weshalb Keratin-Filamente immer Heterodimere aus gleichen Zahlen von Keratin-Polypeptiden der Typen I und II sind.

Eine einzelne Epithelzelle kann verschiedene Keratine herstellen, die alle zu einem einzigen System von Keratin-Filamenten co-polymerisieren. Die einfachsten Epithelien, z.B. im frühen Embryo und in manchen ausgereiften Geweben wie der Leber, enthalten nur jeweils ein Keratin des Typs I und II. An anderen Stellen, beispielsweise in Zunge, Blase und Schweißdrüsen, enthalten die Epithelien sechs oder mehr Keratine, wobei die jeweilige Kombination von der Lage der Zelle in dem Organ abhängt. Am ausgeprägtesten ist die Vielfalt in der Haut: hier exprimieren die Zellen der einzelnen Epidermisschichten unterschiedliche Kombinationen von Keratinen. Manche Keratine sind auch charakteristisch für Epithelzellen, die sich aktiv teilen. Diese Heterogenität der Keratine kann man sich in der Medizin zunutze machen: bei der Diagnose von Krebserkrankungen der Epithelien (Carcinomen) kann man anhand der jeweils exprimierten Kombination von Keratinen feststellen, aus welchem Epithelgewebe der Tumor stammt, und das ist ein wichtiger Faktor für die Auswahl der wirksamsten Behandlungsmethode.

Anders als die Keratine können Vimentin und die Vimentin-ähnlichen Proteine Intermediärfilamente bilden, die Polymere aus Proteinmolekülen eines einzigen Typs darstellen. Vimentin ist das am weitesten verbreitete Protein der Intermediärfragmente im Cytoplasma; es kommt in vielen Zellen vor, die vom Mesoderm abstammen, unter anderem in Fibroblasten, Endothelzellen und weißen Blutzellen; auch viele andere Zellen exprimieren es vorübergehend während der Entwicklung. Desmin findet man vorwiegend in Muskelzellen: es ist im Cytoplasma glatter Muskelzellen verteilt und verbindet in den Zellen der Skelett- und Herzmuskulatur die benachbarten Myofibrillen. Das saure fibrilläre Gliaprotein bildet Gliafilamente in den den Astrozyten des Zentralnervensystems und in manchen Schwann-Zellen der peripheren

Nerven. Alle diese Proteine co-polymerisieren leicht miteinander, und solche Co-Polymere aus Vimentin und Vimentin-ähnlichen Proteinen findet man bei einer Reihe ausgereifter Zellen. Dagegen co-polymerisiert keines dieser Proteine mit den Keratinen: werden Keratine und Vimentin in derselben Zelle exprimiert, bilden sie getrennte Filamentsysteme.

In Epithelzellen sind die Keratin-Filamente an spezialisierte Zellverbindungen gekoppelt, und zwar sowohl an die Desmosomen, die benachbarte Zellen verbinden, als auch an die Hemidesmosomen, die für die Verankerung der Zelle an der darunterliegenden Basalmembran sorgen. Da die Keratin-Filamente jeder Zelle über die Desmosomen mit denen der Nachbarzelle verknüpft sind, bilden sie im ganzen Epithel ein zusammenhängendes Geflecht. In ähnlicher Weise sind die Desmin-Filamente oft an spezialisierten Zellverbindungen der Muskelzellen festgeheftet.



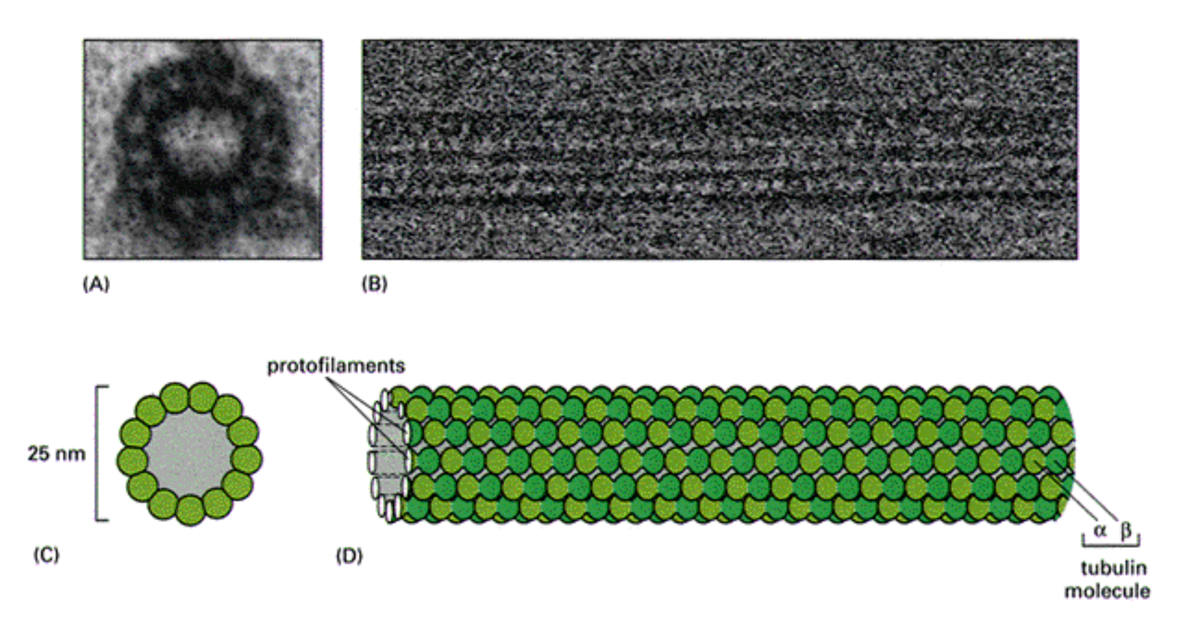
077: Färbung eines Präparates mit anti-Desmosin Antikörpern

MIKROTUBULI

Mikrotubuli sind lange, steife Polymere, die sich durch das Cytoplasma erstrecken und die Lage der Membran-umhüllten Organellen und anderer Zellbestandteile steuern. Mikrotubuli bestehen aus Tubulin-Molekülen; jedes davon ist ein **Heterodimer** aus zwei nahe verwandten, eng gekoppelten globulären Polypeptiden namens **α-Tubulin** und **ß-Tubulin**. Tubulin kommt in praktisch allen eukaryontischen Zellen vor. Am häufigsten findet man Tubulin im Gehirn von Wirbeltieren (10 bis 20 % des gesamten löslichen Proteins), weil in den langen Nervenzellfortsätzen sehr viel Mikrotobuli benötigt wird.

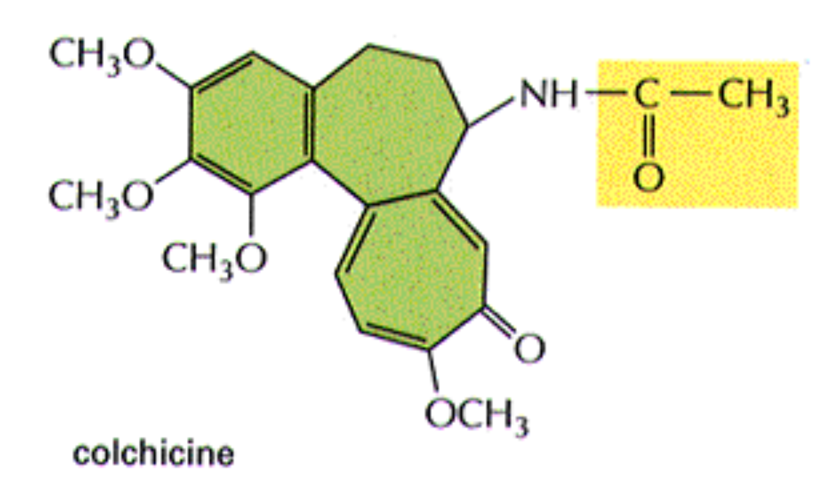
Die Tubulin-Moleküle selbst sind sehr vielfältig. Bei Säugetieren gibt es mindestens sechs Formen von α-Tubulin und eine ähnliche Anzahl von ß-Tubulinen, die jeweils von **eigenen Genen** kodiert werden. Die einzelnen Formen des Tubulins ähneln sich stark, und *in vitro* co-polymerisieren sie meist zu gemischt zusammengesetzten Mikrotubuli, aber *in vivo* sind sie oft an unterschiedlichen Stellen der Zelle lokalisiert, mit z.T. geringfügig unterschiedlichen Aufgaben.

Einen Mikrotubulus kann man als **zylinderförmiges Gebilde** betrachten, in dem die **Tubulin-Heterodimere** um einen zentralen Raum herum angeordnet sind; dieser Raum sieht in elektronenmikroskopischen Aufnahmen leer aus. Genauer ist vielleicht eine Beschreibung, wonach das Ganze aus **13 gestreckten Protofilamenten** aufgebaut ist, die jeweils aus abwechselnd angeordneten Molekülen von α- und ß-Tubulin bestehen und in paralleler Anordnung einen Zylinder bilden. Da die 13 parallelen Protofilamente die **gleiche Polarität** besitzen, ist auch der ganze Mikrotubulus eine polare Struktur, bei der man ein **schnell wachsendes plus-Ende** und ein **langsam wachsendes minus-Ende** unterscheiden kann.



078: Dreizehn Einzelstränge aus Tubulin-Dimeren bilden einen Mikrotubulus

Viele Mikrotubuli-Anordnungen in den Zellen sind labil und müssen das auch sein, um ihre Funktion auszuüben. Eines der eindrucksvollsten Beispiele ist die **Mitosespindel**: sie entsteht, nachdem sich die Mikrotubuli im Cytoplasma zu Beginn der Mitose **aufgelöst** haben. Die Mitosespindel ist der Angriffspunkt verschiedener Mitose-hemmender Wirkstoffe, die den Austausch der Tubulin-Untereinheiten zwischen den Mikrotubuli und dem Vorrat an freiem Tubulin beeinträchtigen. Eine solche Substanz ist **Colchicin**, ein Alkaloid aus der Herbstzeitlose, das schon die alten Ägypter zur Behandlung der Gicht verwendeten.



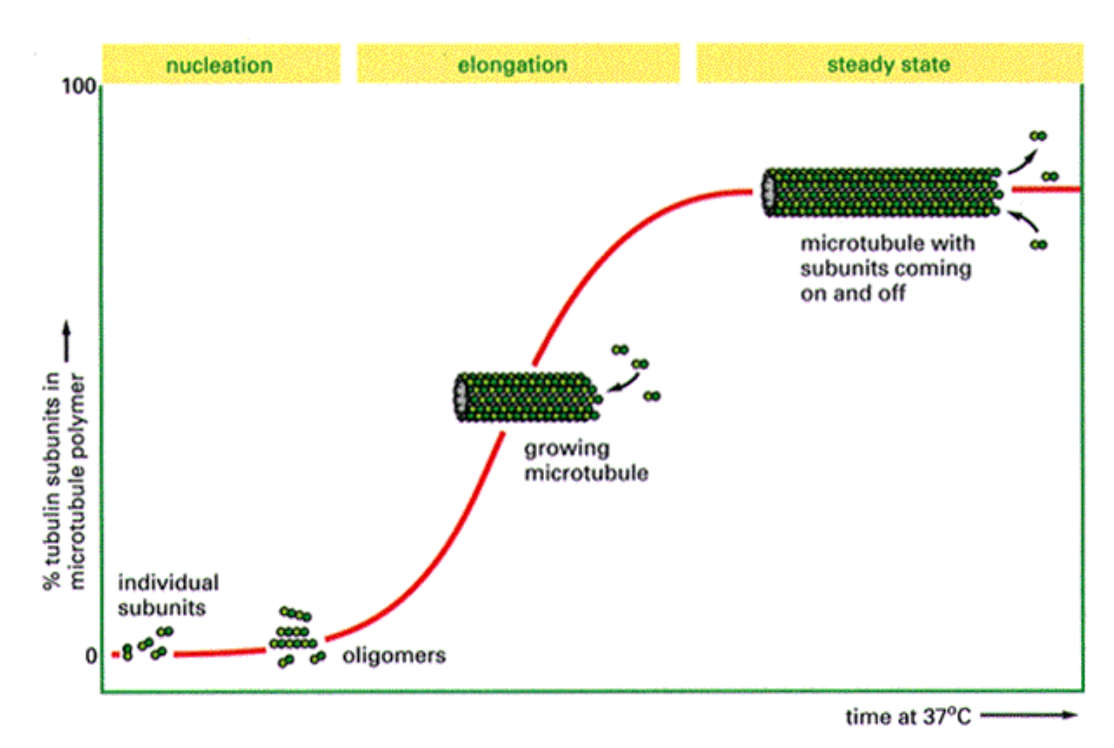
079: Chemische Struktur von Colchicin

Jedes Colchicin-Molekül **bindet fest** an ein Molekül des Tubulins und **verhindert**, daß es **polymerisiert**, aber wenn das Tubulin bereits polymerisiert ist und sich in einem Mikrotubulus befindet, kann das Colchicin nicht mehr angreifen. Behandelt man eine Zelle während der Zellteilung mit Colchicin oder der chemisch eng verwandten Verbindung Colcemid, so **verschwindet die Mitosespindel** schnell; daraus kann man schließen, daß sich normalerweise durch ständigen Austausch von Untereinheiten zwischen Mikrotubuli und dem Vorrat an freiem Tubulin ein Gleichgewicht einstellt. Die vorübergehende Zerstörung der Mikrotubuli in der Mitosespindel tötet bevorzugt Zellen ab, die sich anormal teilen, und deshalb verwendet man **Mitosehemmer** wie **Vinblastin** und **Vincristin** (die ähnlich wirken wie Colcemid) häufig in der **Krebstherapie**.

Die entgegengesetzte Wirkung hat **Taxol**, das aus der Rinde von Taxusbäumen gewonnen wird. Es **bindet stark** an die Mikrotubuli und **stabilisiert** sie; setzt man es Zellen zu, wird ein großer Teil des freien Tubulins in Mikrotubuli eingebaut. Die Stabilisierung der Mikrotubuli hält Zellen, die sich teilen, in der Mitose fest, weil die Mikrotubuli nicht mehr depolymerisieren können. Deshalb dient Taxol ebenfalls häufig als **Krebsmedikament**, und kürzlich wurde eine Methode zur stereospezifischen chemischen Synthese dieses Wirkstoffs beschrieben.

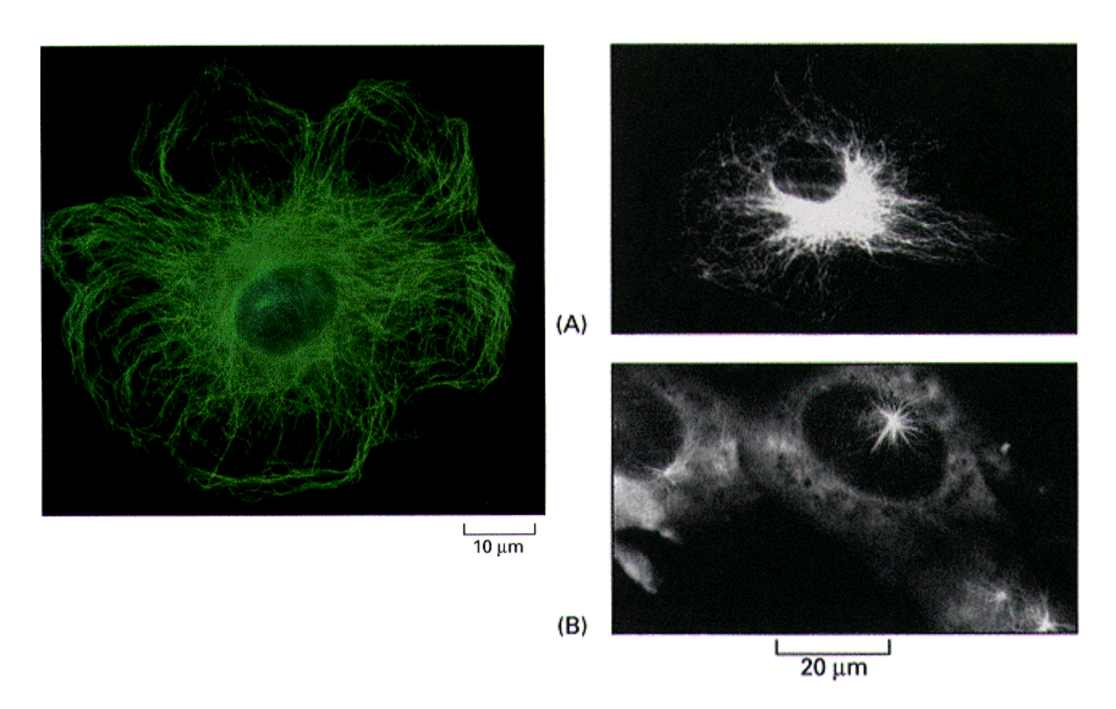
080: Chemische Struktur von Taxol

Reines Tubulin polymerisiert bei 37 °C *in vitro* zu Mikrotubuli, wenn Mg^{2+} und GTP vorhanden sind. Verfolgt man die Polymerisation durch Lichtbrechungsmessungen oder im Mikroskop, erkennt man anfangs eine langsame Phase; anschließend wachsen die Mikrotubuli schnell, bis die Polymerisation eine Plateauphase erreicht. Die langsame Anfangsphase erklärt sich dadurch, weil das Anfügen von Untereinheiten an einen bestehenden Mikrotubulus viel einfacher ist als die Bildung eines ganz neuen Mikrotubulus. In der Phase der schnellen Polymerisation sorgt die hohe Konzentration an freiem Tubulin dafür, daß die Mikrotubuli schneller polymerisieren als depolymerisieren. Wenn die Polymerisation die Plateauphase erreicht hat, stehen dissoziierende und abdissoziierende Tubulin-Moleküle im Gleichgewicht. Ein typischer Fibroblast enthält etwa 20 μmol Tubulin (2 mg/ml), und davon liegen 50 % in den Mikrotubuli und 50 % frei vor.



081: Kinetik der Tubulin-Polymerisation

Man kann die Mikrotubuli im Cytoplasma einer Interphasezelle sichtbar machen, indem man die Zellen fixiert und dann mit fluoreszierenden Antikörpern gegen Tubulin anfärbt. Dabei findet man die größte Dichte der Mikrotubuli rund um den Zellkern, und von dort aus erstrecken sie sich als dünne, filigranartige Fäden bis zur Zellperipherie.



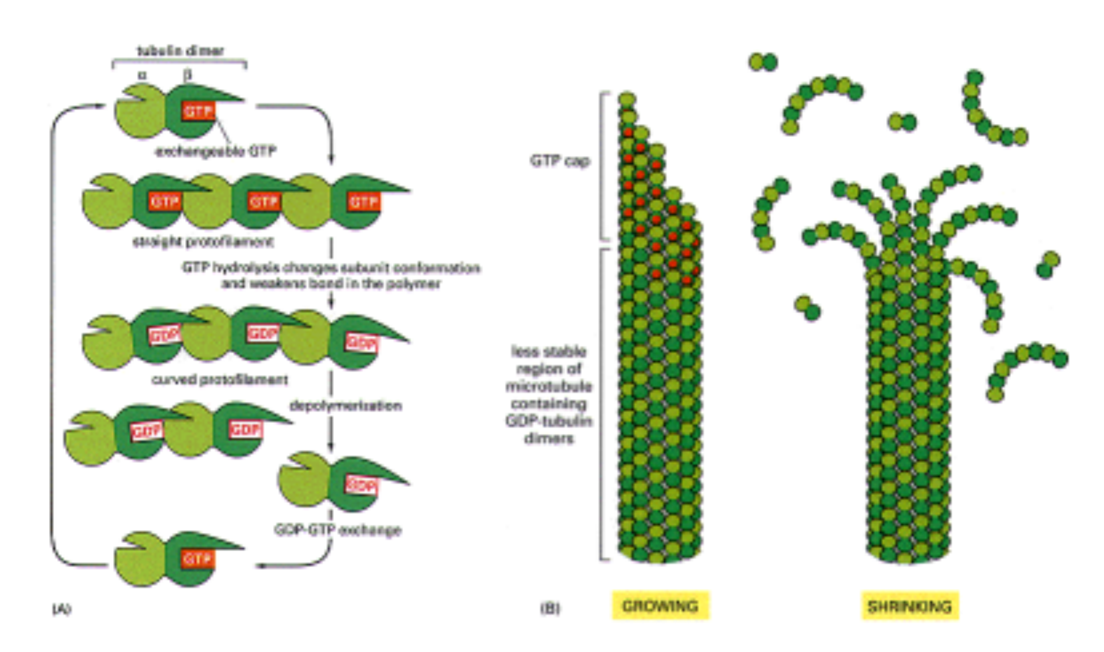
082: Links: Anti-Tubulin Antikörper-Färbung; Rechts Darstellung des Mikrotubuli-Systems mit (unten) und ohne Colcemid-Hemmung (oben).

Den Ausgangspunkt der Mikrotubuli erkennt man am besten, wenn man sie zuerst in Anwesenheit von Colcemid das Mikrotubuli-System depolymerisiert und dann erneut polymerisieren läßt, indem man den Hemmstoff auswäscht. Die neuen Mikrotubuli wachsen vom **Centrosom** aus und bilden eine kleine, sternförmige Struktur, die **Astere**, und wachsen anschließend bis die ursprüngliche Verteilung wiederhergestellt ist. Dabei "wächst" der Mikrotubulus mit den Plus-Enden der 13 Protofilamenten weg vom Centrosom.

Das Centrosom ist in fast allen Tierzellen das wichtigste Mikrotubuli-Organisationszentrum. In der **Interphase** (des Zellzykluses) liegt es meist auf einer Seite des Zellkerns, dicht über der Außenfläche der Kernhülle. In das Centrosom ist ein Paar zylinderförmiger Strukturen eingebettet, die rechtwinklig zueinander (L-Form) orientiert sind. Diese Gebilde sind die **Centriolen**. Das Centrosom verdoppelt sich in der Interphase und teilt sich in zwei gleiche Teile auf, die jeweils ein Paar der ebenfalls verdoppelten Centriolen enthalten. Diese beiden Tochter-Centrosomen wandern zu Beginn der Mitose zu entgegengesetzten Seiten des Zellkerns und bilden die **Pole der Mitosespindel**.

Die **Halbwertszeit** eines einzelnen Mikrotubulus liegt bei etwa zehn Minuten, aber die durchschnittliche Lebenszeit eines Tubulin-Moleküls von der Synthese bis zum proteolytischen Abbau beträgt über 20 Stunden. Jedes Tubulin-Molekül ist also im Laufe seines Lebens am Auf- und Abbau vieler Mikrotubuli beteiligt.

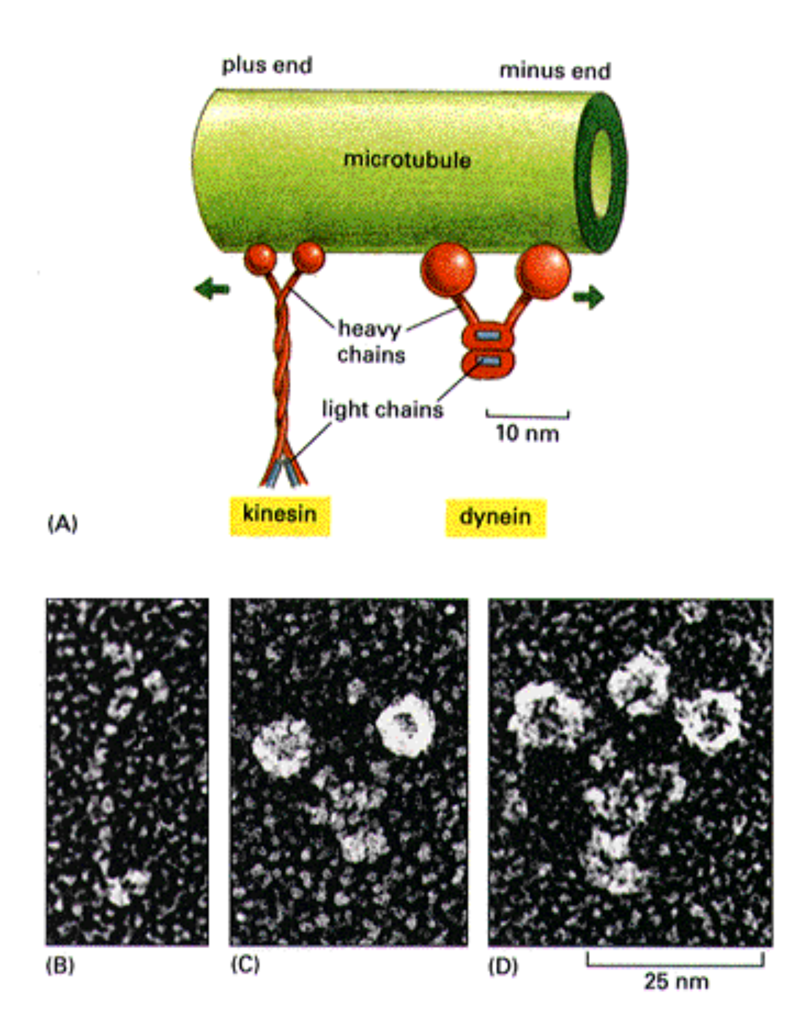
Die **dynamische Instabilität** der Mikrotubuli erfordert die Zufuhr chemischer Energie, die das chemische Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation verschiebt, und diese Energie stammt aus der **Hydrolyse von GTP**. Die Funktion der GTP-Hydrolyse bei der Polymerisation der Mikrotubuli hat man mit GTP-Analoga untersucht, die sich nicht hydrolysieren lassen. Tubulin-Moleküle, die solche nicht hydrolysierbaren GTP-Analoga enthalten, bilden normale Mikrotubuli. Offensichtlich ist also die Bindung, nicht aber die Hydrolyse dieses Moleküls für die Polymerisation der Mikrotubuli erforderlich. Allerdings sind solche Mikrotubuli ungewöhnlich stabil: sie depolymerisieren nicht wie normale Mikrotubuli, wenn die Tubulin-Konzentration in der umgebenden Flüssigkeit abnimmt oder wenn man sie mit Colchicin behandelt. Die normale Funktion der Hydrolyse von GTP besteht also offenbar darin, daß sie die Bindungen zwischen den Tubulin-Untereinheiten schwächt und so den Mikrotubuli die Depolymerisation ermöglicht.



083: Modell zur Asso- und Dissoziation von einzelnen Tubulin-Heterodimeren

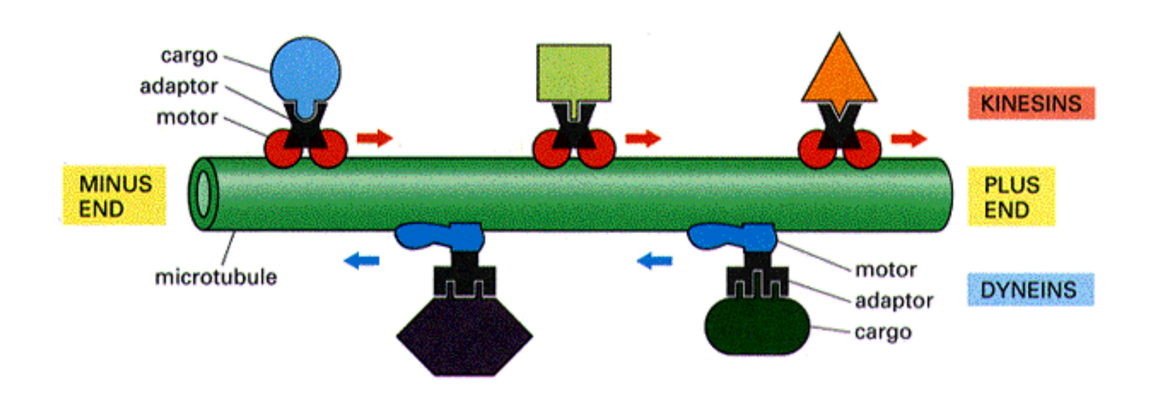
Anmerkung: Zellen können die dynamische Instabilität ihrer Mikrotubuli für bestimmte Zwecke abwandeln. So steigt in der Mitose-Phase des Zellzyklus die Auf- und Abbaugeschwindigkeit der Mikrotubuli stark an; auf diese Weise können die Chromosomen leicht wachsende Mikrotubuli einfangen, und die Mitosespindel kann sich schnell ausbilden. Das Umgekehrte geschieht, wenn eine Zelle sich terminal differenziert und eine bestimmte äußere Form annimmt: dann wird die dynamische Instabilität ihrer Mikrotubuli oft unterdrückt, und zwar durch Proteine, die an die Mikrotubuli binden und sie stabiler gegen den Abbau machen.

Mit Hilfe der videoverstärkten Lichtmikroskopie wurden die **Mikrotubuli-„Motoren"** entdeckt: die **Kinesine** und die cytoplasmatischen **Dyneine**.



084: Mikrotubulimotoren können sich entlang der Mikrotubuli gerichtet bewegen

Cytoplasmatische Dyneine sind am **Transport der Organellen** sowie an der **Mitose** beteiligt und ähneln stark dem Cilien-Dynein, dem Motorprotein der Cilien und Geißeln (wird hier aus Zeitgründen nicht besprochen). Die **Kinesine** sind vielgestaltiger und verschiedene Proteine aus dieser Familie wirken bei **Organelltransport**, **Mitose**, **Meiose** und dem **Transport sekretorischer Vesikel** mit. Beide Motorproteine bestehen aus *zwei schweren* und *mehreren leichten Protein-Ketten*. Jede schwere Kette enthält einen evolutionär konservierten, globulären Kopf, der ATP bindet, und einen Schwanz aus einer Reihe stäbchenförmiger Domänen. Die beiden Kopf-Domänen sind **ATPase-Motoren** und binden an die Mikrotubuli, während die Schwanz-Domänen sich im allgemeinen **an bestimmte Zellbestandteile heften** und so festlegen, welche Fracht das Protein transportiert. Die meisten bekannten Motorproteine bewegen sich nur in einer Richtung an den Mikrotubuli entlang, entweder zum plus- oder zum minus-Ende hin: die Kinesine wandern im allgemeinen zum **plus-Ende** eines Mikrotubulus (d.h. weg vom Centrosom), die Dyneine dagegen bewegen sich zum **minus-Ende** und damit zum Centrosom hin.



085: Motorproteine sind für intrazelluläre Bewegungsvorgänge essentiell

Die Mikrotubuli-abhängigen Motorproteine sind von großer Bedeutung für die Lage der membranumhüllten Organellen in einer Eukaryontenzelle. Die Membranröhren des Endoplasmatischen Reticulums (ER) liegen beispielsweise parallel zu den Mikrotubuli und erstrecken sich fast bis zum Rand der Zelle, während der Golgi-Apparat sich in der Nähe des Centrosoms befindet. Behandelt man die Zellen mit einem Wirkstoff, der die Mikrotubuli entpolymerisiert, ändern diese beiden Orga-

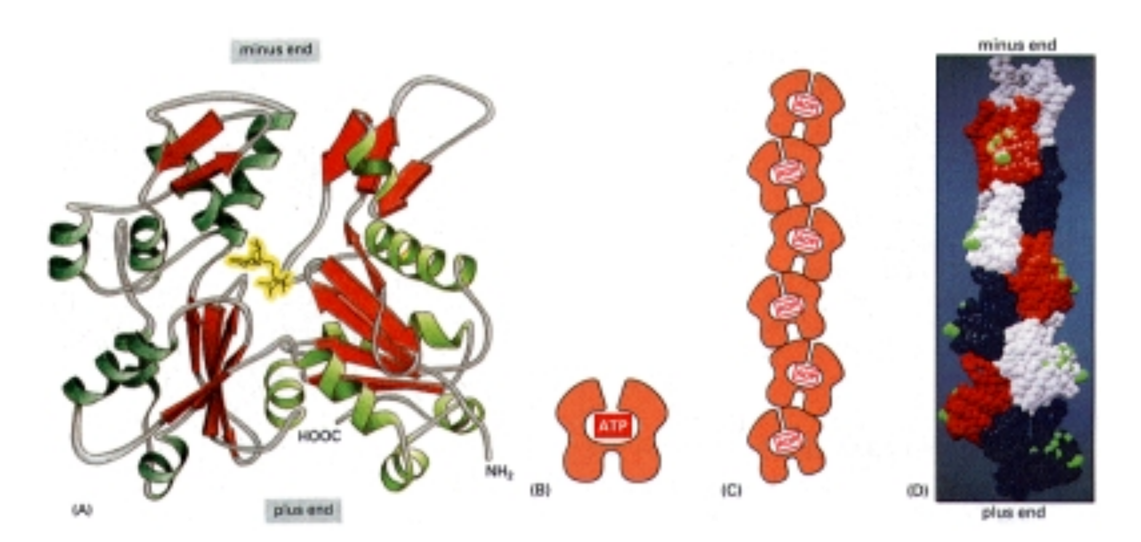
nellen ihre Lage: das ER bricht in der Mitte der Zelle zusammen, und der Golgi-Apparat zerfällt in kleine Vesikel, die sich im Cytoplasma verteilen. Entfernt man den Wirkstoff, kehren die Organellen in ihre ursprüngliche Position zurück, gezogen vom Motorproteinen, die sich an den wiederhergestellten Mikrotubuli entlangbewegen. Die normale Lage dieser Organellen wird also vermutlich jeweils von einem Rezeptorprotein auf der dem Cytosol zugewandten Seite ihrer Membran bestimmt, das einen spezifischen Mikrotubuli-abhängigen „Motor" bindet; beim ER ist das ein Kinesin, beim Golgi-Apparat ein Dynein.

ACTIN-FILAMENTE

Alle Eukaryonten-Arten enthalten **Actin**. In vielen eukaryontischen Zellen ist dieser Bestandteil des Cytoskeletts das **häufigste Protein**, das über 5 % der gesamten Proteinmenge in der Zelle ausmacht (Skelettmuskelzellen von Wirbeltieren: etwa 20 %). Behandelt man getrocknete und gemahlene Muskeln mit einer stark verdünnten Salzlösung, so dissoziieren die **Actin-Filamente** in ihre Actin-Untereinheiten. Jedes **Actin-Molekül** ist ein einziges Polypeptid aus **375 Aminosäuren**, das ein eng **gebundenes ATP-Molekül** trägt.

Actin-Filamente können in den Zellen sowohl stabile als auch labile Strukturen ausbilden. Stabile Actin-Filamente sind z.B Bestandteil des kontraktilen Apparats in den Muskelzellen, andere Zellbewegungen beruhen jedoch auf labilen Strukturen aus Actin-Filamenten.

Actin-Filamente erscheinen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als Fäden von etwa **8 nm Dicke**. Sie bestehen aus einer eng gewundenen Helix aus gleich orientierten Actin-Molekülen, die man auch als **globuläres Actin** oder **G-Actin** bezeichnet. Wie die Mikrotubuli, so sind auch die Actin-Filamente **polare Gebilde**, deren Enden unterschiedliche Strukturen haben: ein relativ inaktives, langsam wachsendes minus-Ende und ein **schneller wachsendes plus-Ende**. Die Raumstruktur des Actin-Moleküls wurde durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt, und aus der so gewonnenen Information konnte man die Struktur der Actin-Filamente auf der Ebene der einzelnen Aminosäuren ableiten.

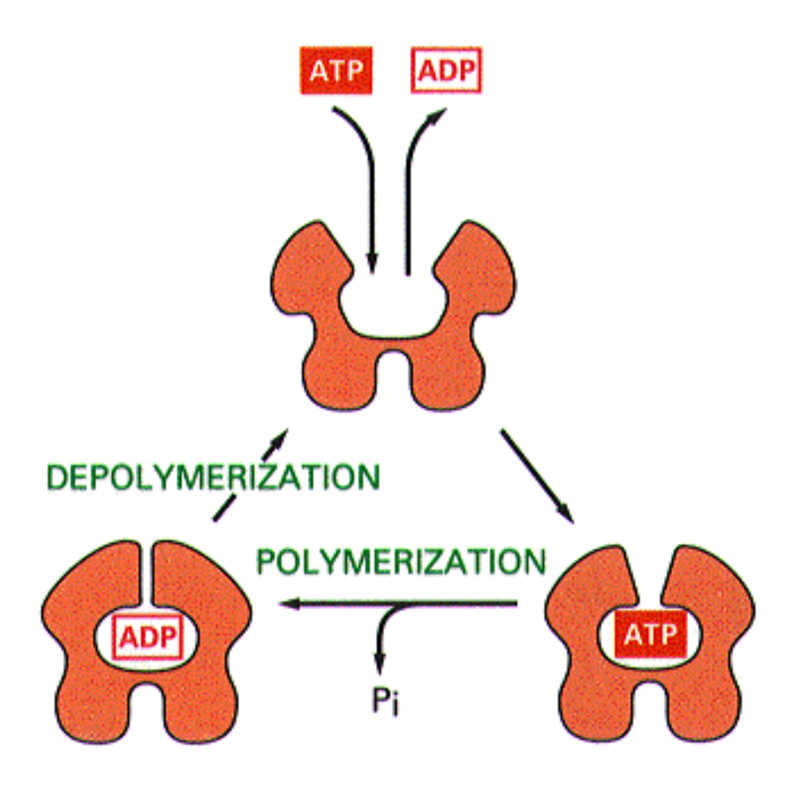


086: Struktur von Actinfilamenten: Aufbau aus einzelnen Monomeren

Bei höheren Eukaryonten gibt es mehrere Isoformen des Actins, die in einer ganzen Familie von Actin-Genen kodiert sind. In Säugergeweben findet man mindestens sechs Actin-Typen, die man anhand ihres isoelektrischen Punktes in drei verschiedene Klassen einteilen kann. Die **α-Actine** kommen in den verschiedenen Muskelgeweben vor, **ß-** und **γ-Actine** sind die wichtigsten Bausteine in Nicht-Muskelzellen. Die einzelnen Formen des Actins unterscheiden sich geringfügig in ihren Eigenschaften, aber ihre Aminosäuresequenzen sind in der Evolution sehr konstant geblieben, und alle Formen lagern sich zu Filamenten zusammen.

Die Gesamtlänge der Actin-Filamente in einer Zelle ist mindestens **30-mal** so groß wie die der Mikrotubuli; in dieser Differenz spiegeln sich grundlegende Unterschiede in Aufbau und Funktion der beiden Cytoskelett-Polymere wider. Actin-Filamente sind dünner, biegsamer und meist auch viel kürzer als Mikrotubuli. Einzelne Actin-Filamente beobachtet man in der Zelle kaum; meist bilden sie **quervernetzte Ansammlungen** und **Bündel**, die viel kräftiger sind als ein einzelnes Filament. Zur Polymerisation sind **ATP** sowie ein- und **zweiwertige Ionen**, gewöhnlich K^+ und Mg^{2+}, erforderlich.

Kurz nach der Polymerisation wird das endständige Phosphat des gebundenen ATP-Moleküls hydrolysiert, und das dabei entstehende ADP wird im Polymer festgehalten. Die ATP-Hydrolyse bei der Polymerisation des Actins ist analog zu der Hydrolyse von GTP beim Aufbau der Mikrotubuli, aber beim Actin versteht man die dabei mitwirkenden Konformationsänderungen, weil man seine genaue Raumstruktur kennt. Das Actin-Molekül ist muschelförmig und bindet das ATP in der Vertiefung zwischen seinen beiden Hälften; es kann sich wie eine Muschelschale öffnen und schließen. Wenn das Actin polymerisiert, klappt die „Schale" zu, weil Aminosäuren an ihren Rändern und auf der Rückseite der nächsten Untereinheit in Wechselwirkung treten. Die Hydrolyse des ATP wird vermutlich durch das Schließen der Muschelschale ausgelöst, wenn das Actin-Molekül in das Filament aufgenommen wird; das ADP wird dabei im Inneren festgehalten. Auch in diesem Fall ist die Hydrolyse nicht zur Bildung des Filaments erforderlich, sondern sie dient dazu, die Bindungen in dem Polymer abzuschwächen und so die Depolymerisation zu fördern.



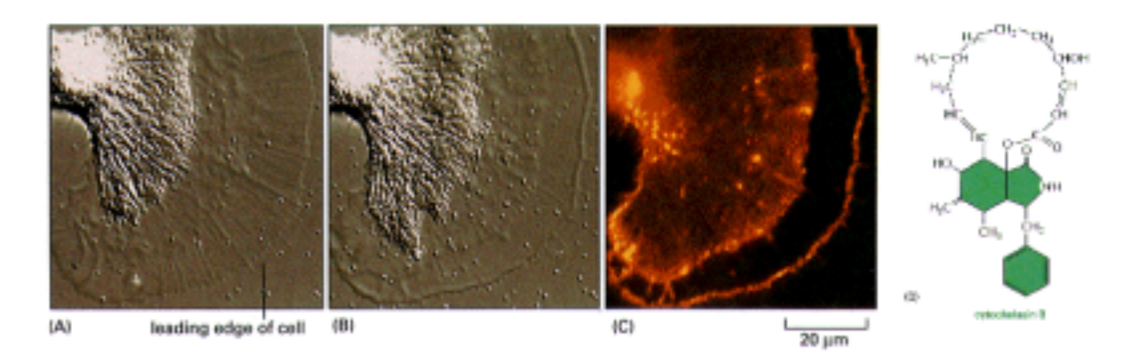
087: Actin-Monomere binden ATP und polymerisieren in der ADP-Form

Besonders interessant ist dabei, daß der ATP/ADP-Austausch (d.h. der Austausch des gebundenen ADP gegen ATP) bei freiem Actin relativ langsam verläuft (Halbwertszeit mehrere Minuten), während der GTP/GDP-Austausch bei Tubulin eine Sache weniger Sekunden ist. Wenn Actin-Moleküle durch Abbau eines Filaments freigesetzt werden, können sie also erst mit relativ langer Verzögerung wieder zum Neuaufbau eines Filaments dienen. Im Prinzip erlaubt diese Eigenschaft des Actins der Zelle, im Cytosol eine relativ hohe Konzentration an unpolymerisierten Actin-Molekülen in Form von ADP-Actin aufrecht zu erhalten; außerdem kann das Actin-ADP-Monomer in einer Zelle durch die Bindung an ein anderes Protein stabilisiert werden, und damit eröffnet sich eine Möglichkeit, die Polymerisation des Actins zu regulieren.

Chemische Wirkstoffe, die Actin-Filamente stabilisieren oder destabilisieren, sind ein wichtiges Hilfsmittel zur Untersuchung ihres dynamischen Verhaltens in den Zellen. Die **Cytochalasine** sind Produkte von Pilzen, die an das plus-Ende der Actin-Filamente binden und so die weitere **Polymerisation des Actins verhindern**. **Phalloidine** sind Toxine aus dem Knollenblätterpilz Amanita, die sich eng an die Seiten der Actin-Filamente heften und sie vor ihrer eigenen Depolymerisation schützen. Beide Wirkstoffe sind für die Zellen giftig.

Der wichtigste Anwendungsbereich von Cytochalasin liegt in der Untersuchung der Fortbewegung von Zellen. Insbesondere der Leitsaum einer Zelle, die sich bewegt, enthält Actin-Filamente, die ständig polymerisieren und deshalb sehr empfindlich auf Cytochalasin reagieren. In den meisten beweglichen Zellen bewirkt Cytochalasin, daß der Leitsaum sich schnell zurückzieht. Ist die Plasmamembran in diesem Bereich fest an die Unterlage geheftet, sorgt das Cytochalasin allerdings nur für den Rückzug der Actin-Filamente, während die Membran zurückbleibt und weiterhin an der Unterlage klebt.

Phalloidin wird in fluoreszenz-markierter Form vielfach zur Färbung der Actin-Filamente in fixierten Zellen verwendet. Bringt man es durch Mikroinjektion in einen lebenden Fibroblasten, veranlaßt dies alle Actin-Filamente, im Cytoplasma in Zufallsanordnung Filamente zu bilden (starker Blasenbildung und Kontraktion).

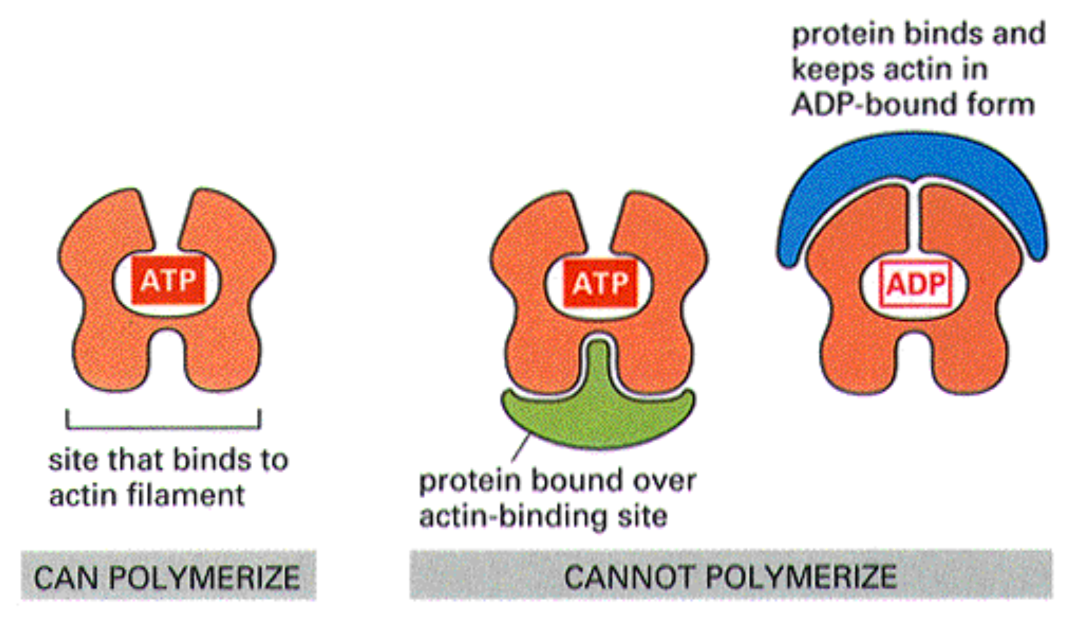


088: Cytochalasine hemmen Actin-Polymerisation

In einer Fibroblastenzelle liegen die Actin-Moleküle ungefähr zu 50 % als Filamente und zu 50 % als Monomere vor. Die Monomeren-Konzentration liegt in einer ganzen Reihe von Zelltypen im typischen Fall zwischen **50 und 200 μM** (2-8 mg/ml). Das ist überraschend viel angesichts der niedrigen kritischen Konzentration des reinen Actins (unter 1 mM); Ursache sind besondere Proteine, die an die Actin-Moleküle binden und ihre Anlagerung an das Ende der Actin-Filamente hemmen. Das häufigste dieser Proteine, die Actin-Monomere binden, ist in vielen Zellen das **Thymosin**, ein ungewöhnlich kleines Protein mit einer molaren Masse von ungefähr 5 KDa. Es wurde besonders eingehend in Blutplättchen und neutrophilen Granulozyten untersucht; in diesen Zellen ist seine Konzentration so hoch, daß es sämtliche Actin-Monomere besetzen kann. Wie dieses Protein die Polymerisation des Actins verhindert, ist jedoch nicht geklärt: möglicherweise blockiert es den Vorgang sterisch, weil es eine Stelle besetzt, an der die Monomere aneinander binden, oder es verhindert den ADP/ATP-Austausch und hält das ADP am Actin fest, so daß das Molekül nicht mehr gut polymerisieren kann.

Ein weiteres Protein, das Actin-Monomere bindet, ist das **Profilin**; es kommt in allen Zellen vor und hat wahrscheinlich eine Funktion bei der Steuerung der Polymerisation als Reaktion auf äußere Reize. Das Profilin, das in vielen Zellen vorwiegend mit der Plasmamembran assoziiert ist, beschleunigt den Austausch von ADP gegen ATP, wenn es an die Actin-Monomere gebunden ist; möglicherweise trägt es dazu bei, die gesteuerte Polymerisation des Actins während der Zellbewegung zu fördern.

Neben Thymosin und Profilin gibt es in den Zellen in großer Menge auch andere Proteine, die an Actin-Monomere binden können, und manche von ihnen, z.B. der **Actin-depolymerisierende Faktor** (ADF) hemmt die Zusammenlagerung des Actins zu Filamenten. Offensichtlich gibt es in den Zellen eine ganze Reihe von Mechanismen, die im einzelnen noch nicht aufgeklärt sind und mit denen die Zelle einen Vorrat an Actin-Monomeren in Reserve hält, damit Actin-Filamente sich dann und nur dann zusammenlagern, wenn sie gebraucht werden.

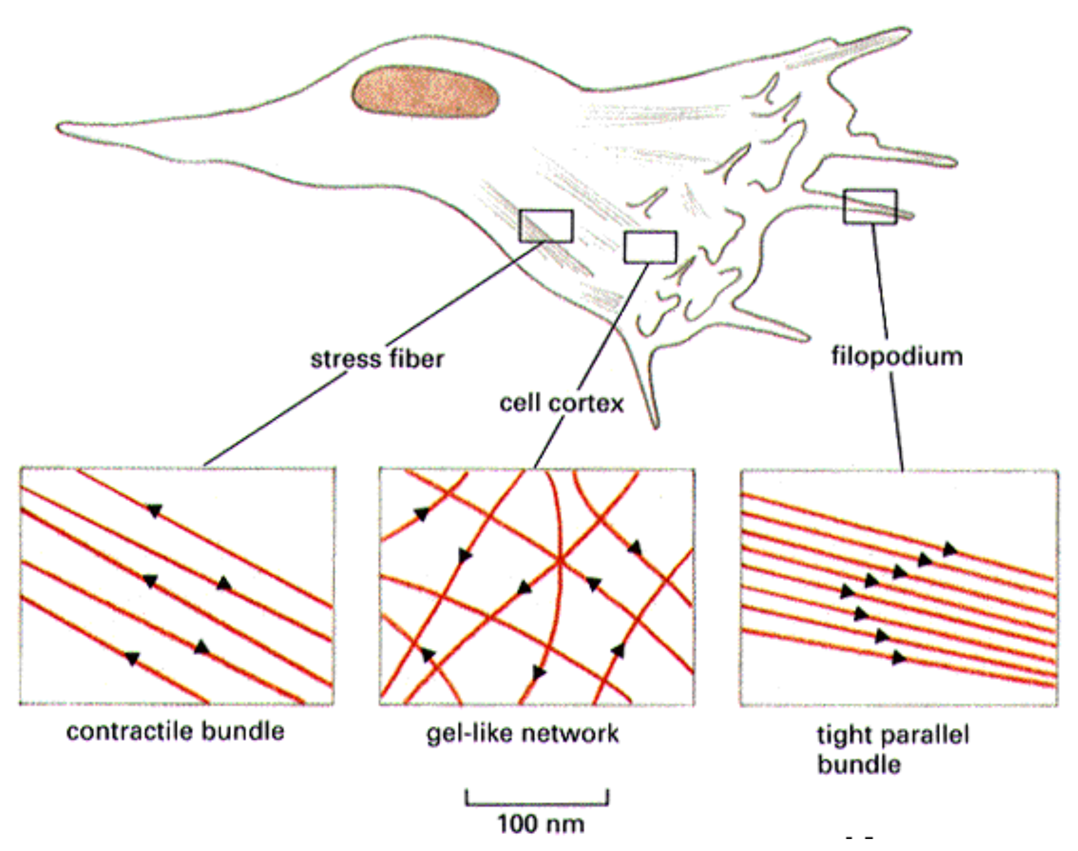


089: Modell zur Regulation von Actin-Monomeren

ACTIN-BINDENDE PROTEINE

In jeder lebenden Zelle gibt es sehr unterschiedliche Strukturen, die alle auf Actin gegründet sind. Die Grundstruktur der Actin-Filamente ist dabei stets die gleiche. Unterschiedlich ist in den verschiedenen Cytoskelett-Anordnungen jedoch die Länge dieser Filamente, ihre Stabilität, sowie die Zahl und Verteilung ihrer Verbindungen (sowohl untereinander als auch mit anderen Zellbestandteilen). Diese Eigenschaften hängen ihrerseits von einer breiten Palette Actin-bindender Proteine ab, die sich an Actin-Filamente heften und ihre Eigenschaften und Funktionen beeinflussen.

Die Actin-Filamente in tierischen Zellen sind nach drei allgemeinen Ordnungsprinzipien organisiert. In den **Parallelbündeln**, die in **Mikrospikes** und **Filopodien** vorkommen, sind die Filamente mit der **gleichen Polarität** orientiert und liegen oft dicht nebeneinander (mit Abständen von 10-20 nm). Die **kontraktilen Bündel** findet man in **Streßfasern** und in dem **kontraktilen Ring**, der die Zellen in der Mitose trennt: hier sind die Filamente mit **entgegengesetzter Polarität** angeordnet; ihre Abstände sind größer (30-60 nm), und sie enthalten das Motorprotein **Myosin II**. Und in dem gelartigen Geflecht der **Zellrinde** sind die Filamente verhältnismäßig locker und offen angeordnet, mit vielen **rechtwinkligen Verbindungen**.

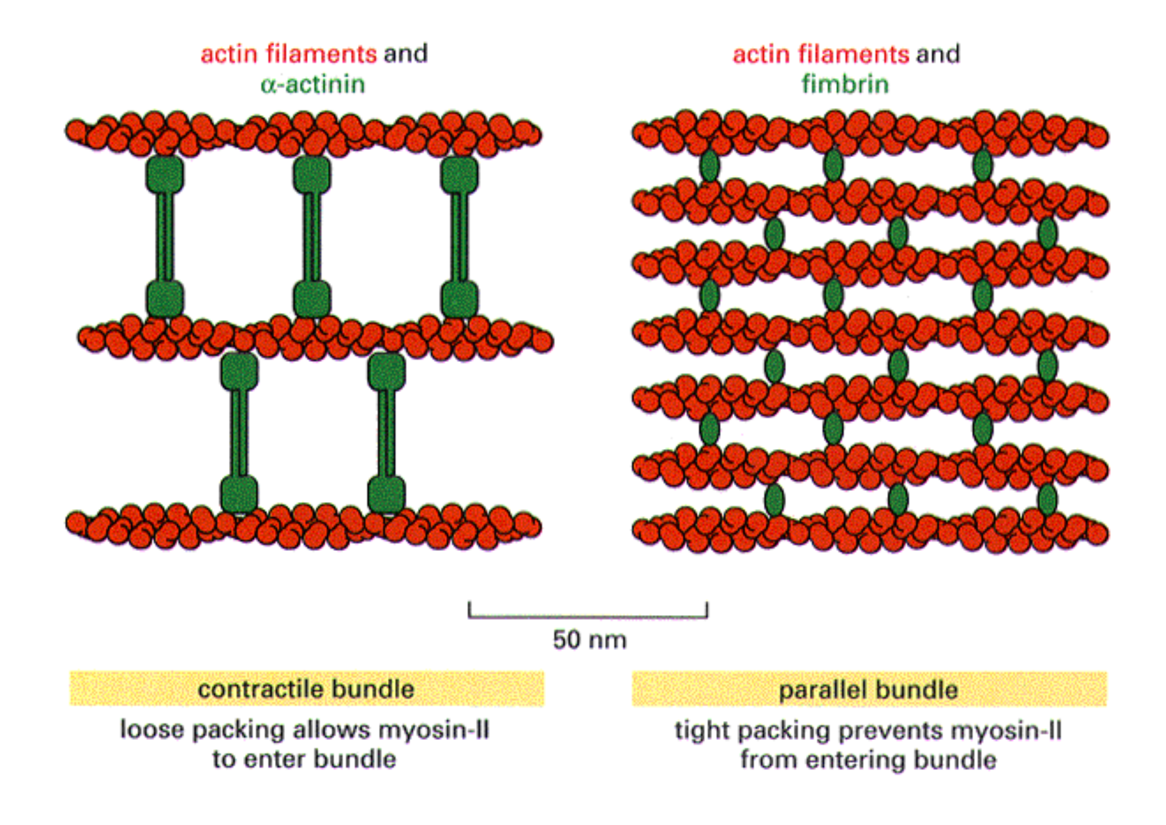


090: Verschiedene Anordnungen von Actin-Filamenten innerhalb der Zelle

Die Vernetzung der Actin-Filamente wird durch Vernetzungproteine gewährleistet: Bündelungsproteine und Gel-bildende Proteine. Die **Bündelungsproteine** koppeln die Actin-Filamente in **Parallelanordnung** und sind von Bedeutung für die Entstehung enger paralleler Bündel wie auch der zuvor beschriebenen, lockeren kontraktilen Bün-

del aus Actin-Filamenten. Die **Gel-bildenden Proteine** dagegen verknüpfen die Actin-Filamente **über Kreuz**, so daß ein lockeres Gel entsteht.

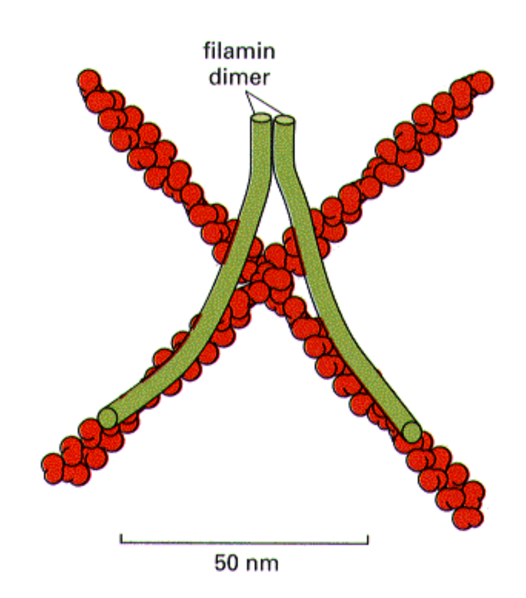
Die verbreitetsten Bündelungsproteine sind Fimbrin und α-Actinin. **Fimbrin** ist in den parallelen Filament-Bündeln am Leitsaum der Zellen angereichert (Mikrospikes und Filopodien) und es ist für die enge Verbindung der Actin-Filamente in diesen Anordnungen verantwortlich. **α-Actinin** findet sich in großer Menge in den Streßfasern und bewirkt die relativ lockere Verknüpfung der Actin-Filamente. Außerdem ist α-Actinin wichtig, um die Enden der Streßfasern an den **Fokalkontakten der Plasmamembran** zu verankern. **Myosin** ist das Motorprotein, das den Streßfasern und anderen kontraktilen Anordnungen ihre Fähigkeit zum Zusammenziehen verleiht.



091: Verschiedene “Packungen” von Actinfilamenten: α-Actinin und Fimbrin

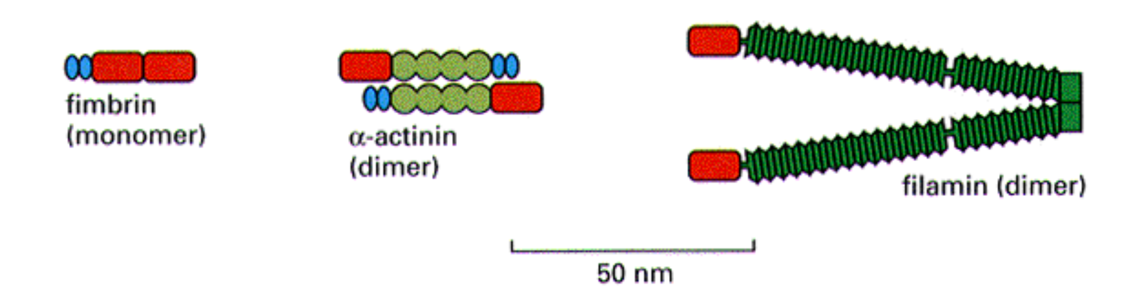
Ein verbreitetes Gel-bildendes Protein ist das Filamin. Es ist in bestimmten Abschnitten der Zellrinde angereichert. Filamin, ein Homo-

dimer, verbindet jeweils zwei Actin-Filamente überkreuzt, und fördert so die Bildung eines lockeren, sehr viskosen Geflechts. Es ist in vielen Tierzellen in großer Menge vorhanden, ein Hinweis, daß das Actin vorwiegend in Form dieses lockeren Geflechts organisiert ist.



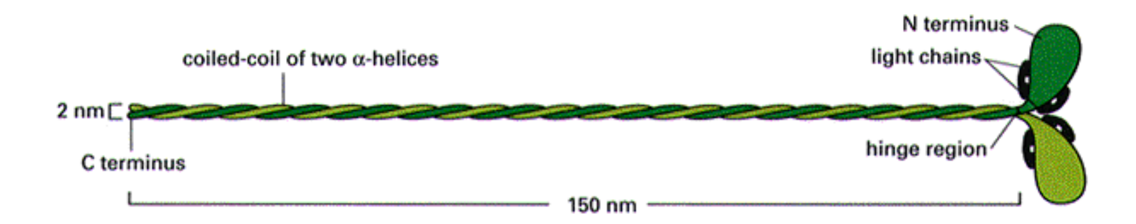
092: Filamin gewährt die Kreuzvernetzuung zwischen zwei Actinfilamenten

Fimbrin, α-Actinin und Filamin enthalten jeweils zwei Domänen, die Actin-Filamente binden können. Diese Actin-bindenden Domänen haben in allen genannten Proteinen eine ähnliche Struktur. Länge und Biegsamkeit der Zwischensequenzen, welche die beiden Actin-bindenden Stellen trennen, sind in den drei Proteinen unterschiedlich, und diese Unterschiede sorgen für die unterschiedlichen Eigenschaften der Querbrücken. Offensichtlich sind alle diese Proteine durch Evolution aus einem einzigen Actin-bindenden Vorläuferprotein hervorgegangen.



093: Schematische Stuktur von Fimbrin, α-Actinin und Filamin

Das Motorptotein **Myosin** wurde zusammen mit dem **Actin** zunächst in der **Skelettmuskulatur** entdeckt, und aus diesen Arbeiten stammen auch viele Kenntnisse über die Wechselwirkungen der beiden Proteine. Das Myosin in den Muskeln gehört zur **Unterfamilie Myosin-II**, deren Mitglieder alle **zwei Köpfchen** und einen langen, **stabförmigen Schwanz** haben; jeder der beiden Köpfe hat sowohl **ATPase**- als auch **Bewegungsaktivität**. Ein Myosin-II-Protein besteht aus **zwei gleichartigen schweren Ketten**, die jeweils im Komplex mit **zwei leichten Ketten** vorliegen. Der aminoterminale Teil der schweren Kette bildet den Kopf mit der **Motor-Domäne**, die carboxyterminale Hälfte der schweren Kette liegt als lange α-Helix vor. Zwei schwere Ketten verbinden sich, indem ihre α-helikalen Abschnitte sich in Form einer Doppelwendel umeinander winden und so ein stabiles Dimer mit zwei Köpfchen und einem einzigen, stäbchenförmigen Schwanz bilden.

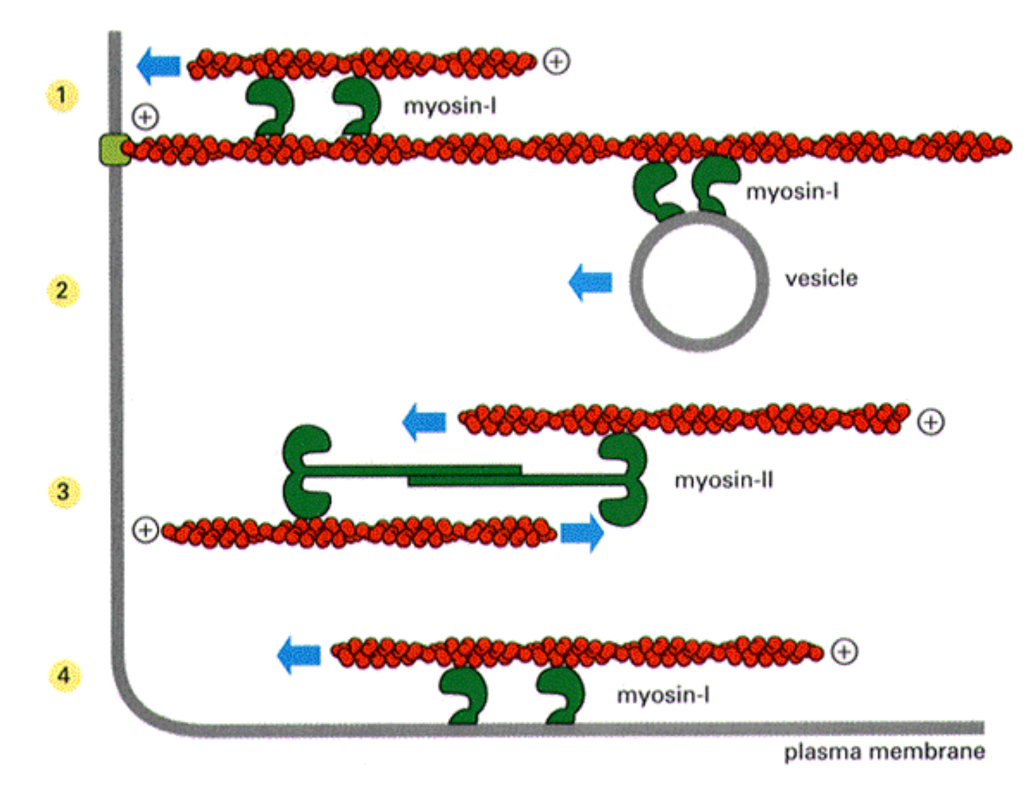


094: Schematische Struktur von Myosin: helikaler Fortsatz und Motordomäne

Eine wichtige Aufgabe der stäbchenförmigen Schwänze von Myosin-II besteht darin, daß sie den Molekülen die Polymerisation zu bipolaren Filamenten ermöglichen. Diese Polymerisation ist entscheidend für die Funktion von Myosin-II, die darin besteht, Gruppen entgegengesetzt orientierter Actin-Filamente aneinander vorbeigleiten zu lassen, wie man es am deutlichsten bei der **Muskelkontraktion** erkennt. Myosin-II ist in der Zellrinde in großer Menge enthalten; in Fibroblasten z.B. kommt ungefähr ein Myosin-II-Molekül auf 100 Actin-Moleküle. Filamente aus Myosin-II im kontraktilen Ring sind verantwortlich für die Einschnürung der Membran bei der Zellteilung, und wahrscheinlich erzeugen sie auch die Zugkräfte in den Streßfasern und einen großen Teil der Kraft, welche die Zelloberfläche straff hält. Ihre Funktion bei der Muskelkontraktion wird später noch genauer besprochen.

Zusätzlich zum Myosin-II, das im allgemeinen das am reichlichsten vorhandene Myosin der Zellen ist, findet man in **Nicht-Muskelzellen** verschiedene kleinere Myosine, von denen das **Myosin-I** am besten charakterisiert ist. Eine einzige Zelle kann mehrere kleinere Myosine enthalten, die jeweils von einem eigenen Gen kodiert werden und eigene Funktionen erfüllen (der Schleimpilz Dictyostelium z.B. besitzt mindestens neun solche Proteine). Das gemeinsame Merkmal aller Myosine ist eine evolutionär konstante Motor-Domäne (Motor-Kopf); die anderen Domänen unterscheiden sich bei den einzelnen Myosinen und bestimmen die besondere Funktion des jeweiligen Proteins in der Zelle.

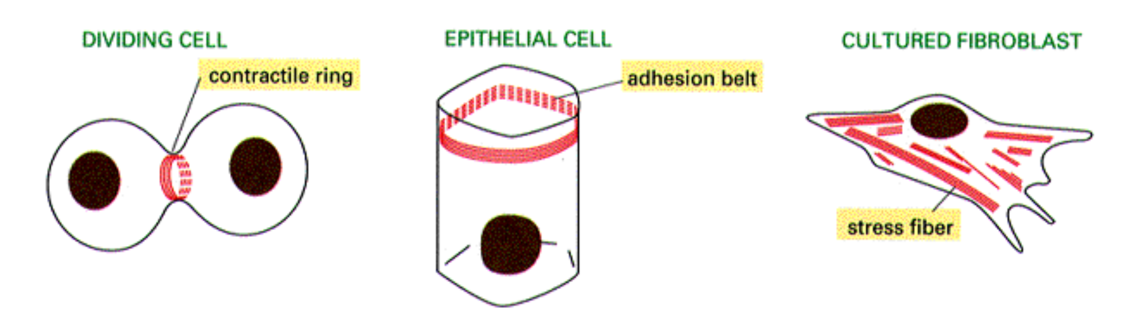
Der Schwanz des Myosins kann eine Membran-bindende Domäne besitzen, eine Stelle, die sich unabhängig von der Kopf-Domäne mit einem zweiten Actin-Filament verbindet (1). Je nach den Eigenschaften des Schwanzes kann ein Myosin-Molekül ein Vesikel an einem Actin-Filament entlang transportieren (2), dafür sorgen, daß zwei Actin-Filamente sich dicht nebeneinanderlagern und dann aneinander vorbeigleiten (3) oder ein Actin-Filament an die Plasmamembran heften (4).



095: Funktionen von Myosin-I & -II Molekülen in der Organisation der Zelle

Alle bekannten Myosine hydrolysieren ATP und bewegen sich mit der dabei gewonnenen Energie vom minus-Ende zum plus-Ende an den Actin-Filamenten entlang.

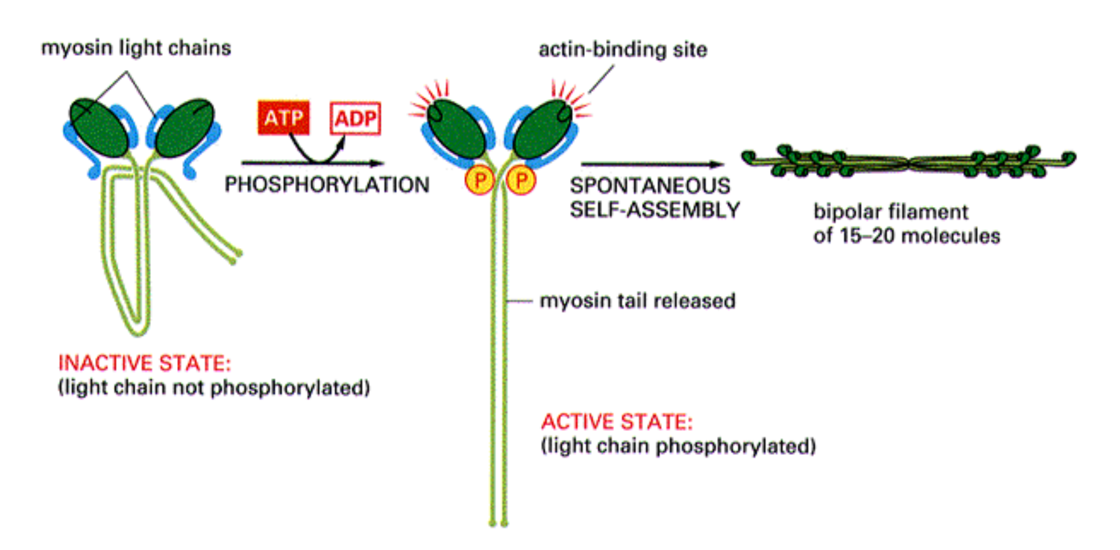
In höheren Eukaryontenzellen bilden sich häufig vorübergehend organisierte kontraktile Bündel aus Actin- und Myosin-II-Filamenten, die eine besondere Aufgabe erfüllen und sich dann wieder auflösen. Am auffälligsten ist der **kontraktile Ring**, ein gürtelartiges Bündel aus Actin- und Myosin-II-Filamenten, das bei Tierzellen die Zellteilung möglich macht. Er taucht während der Mitose-Phase des Zellteilungszyklus unter der Plasmamembran auf und erzeugt Kräfte, welche die Plasmamembran nach innen ziehen und die Zelle in der Mitte einschnüren, bis sich die Tochterzellen schließlich in der Cytokinese trennen. Der kontraktile Ring muß zu Beginn der Zellteilung aus Actin, Myosin und anderen Proteinen aufgebaut werden; diesen Vorgang kann man verfolgen, wenn man Zellen während der Teilung mit fluoreszierenden Antikörpern gegen Myosin anfärbt. Nach Abschluß der Zellteilung verteilen sich die Myosin-II-Moleküle wieder.



096: Drei Beispiele für Actin-Myosin Interaktionen

Ein weiteres Beispiel für vorübergehend gebildete Bündel aus Actin-Filamenten und Myosin-II sind die **Streßfasern**, ein auffälliger Bestandteil des Cytoskeletts von Gewebekultur-Fibroblasten. Sie ähneln in Struktur und Funktion den winzigen Myofibrillen in den Muskeln, die später noch beschrieben werden, sind aber kleiner und weniger gut organisiert. Sie sind mit einem Ende in die Plasmamembran eingelagert, und zwar an besonderen Stellen, den **Fokalkontakten**, an denen die Zellaußenseite eng an die extrazelluläre Matrix geheftet ist.

Wie dieser Vorgang gesteuert wird, ist nicht bekannt, aber es sieht so aus, als wäre Ca^{2+} beteiligt, denn die **Ca^{2+}-abhängige Phosphorylierung** des Myosin-II verstärkt einerseits seine Wechselwirkung mit Actin und trägt andererseits dazu bei, daß es sich zu kurzen, **bipolaren Filamenten** zusammenlagert.

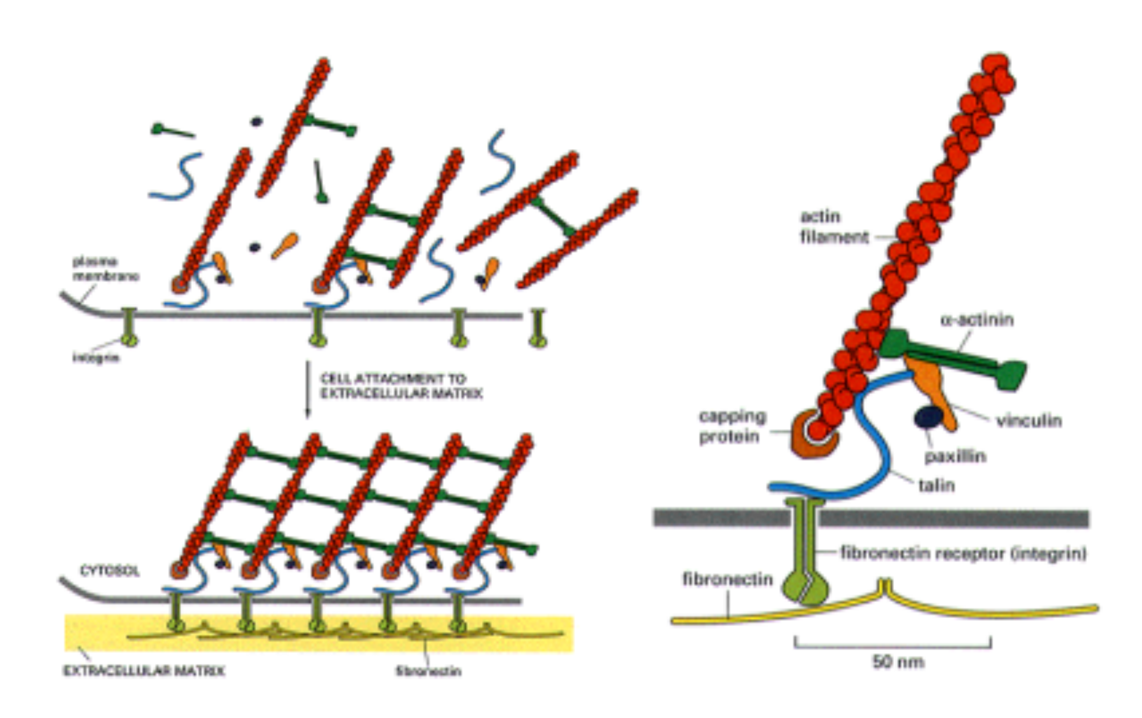


097: Ca^{2+}-abhängige Phosphorylierung von Myosin-II: Bildung bipolarer Filamente

Der Kontraktionsmechanismus aller dieser Cytoskelettbündel beruht auf dem ATP-getriebenen Gleiten der ineinandergreifenden Actin- und Myosin-Filamente und erfordert vermutlich einen ganz bestimmten, geordneten Aufbau, der später im Zusammenhang mit den **Muskeln** genauer erläutert wird.

Damit eine Streßfaser an der extrazellulären Matrix oder einer anderen Zelle ziehen kann, muß sie an der richtigen Stelle fest in der Plasmamembran verankert sein. Die Verbindung zwischen den Actin-Filamenten im Inneren der Zelle und der extrazellulären Matrix auf ihrer Außenseite wird durch Transmembran-Verbindungsproteine in der Plasmamembran hergestellt. Am besten charakterisiert sind hier die Verbindungen zwischen Gewebekultur-Fibroblasten und der extrazellulären Matrix. Wenn Fibroblasten in einer Kulturschale wachsen, ist der größte Teil ihrer Zelloberfläche durch einen über 50 nm breiten Spalt von der Unterlage getrennt; an den **Fokalkontakten** dagegen, auch **Adhäsionsplaques** genannt, vermindert sich dieser Abstand auf 10 bis 15 nm. Dort ist die Plasmamembran an Bestandteile der extrazellu-

lären Matrix geheftet, die an die Kulturschale gebunden haben. Durch Färbung mit Antikörpern gegen Actin kann man eindeutig zeigen, daß diese Bereiche auch die Stellen sind, an denen die Enden der Streßfasern mit der Plasmamembran verbunden sind.

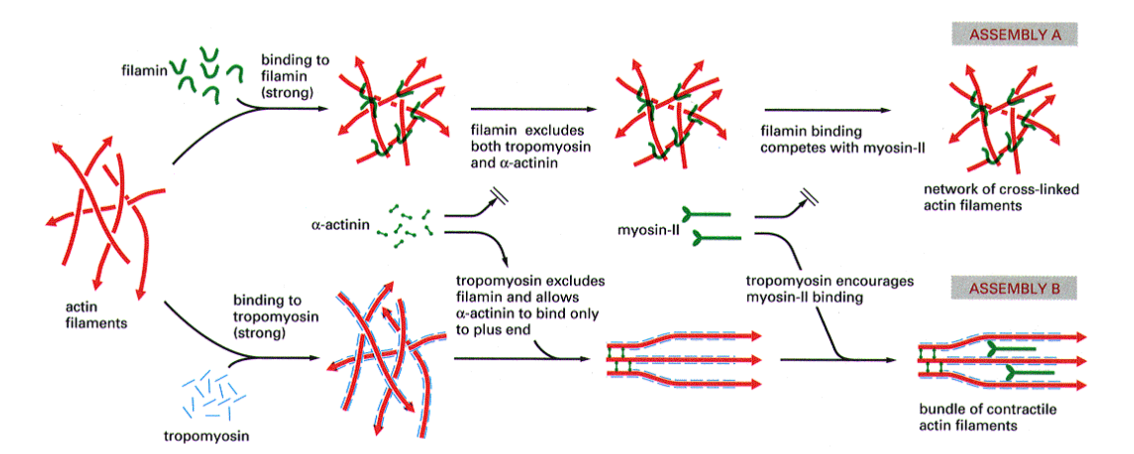


098: Bildung von Adhäsionsplaques nach Adhäsion der Zellen an die Oberfläche

Die wichtigsten Transmembran-Verbindungsproteine der Fokalkontakte gehören zur **Familie der Integrine**. Ihre äußere Domäne bindet an einen Bestandteil der extrazellulären Matrix, und der ins Cytoplasma ragende Teil ist an die Actin-Filamente in den Streßfasern gekoppelt. Es handelt sich um eine indirekte Verbindung, die von mehreren Anheftungsproteinen hergestellt wird. Die cytoplasmatische Domäne des Integrins bindet an das Protein **Talin**, das sich seinerseits an **Vinculin** heftet, ein Protein, das man auch in anderen Actin-haltigen Zellverbindungen findet (z.B. Adhärenzverbindungen). Vinculin lagert sich mit α-Actinin zusammen und wird auf diese Weise an ein Actin-Filament gekoppelt. Die topologischen Verhältnisse bei den Wechselwirkungen der Proteine an den Fokalkontakten wurden bisher nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt; eine hypothetische Anordnung ist aber oben dargestellt.

Neben ihrer Verankerungsfunktion haben die Fokalkontakte auch die Aufgabe, **Signale von der extrazellulären Matrix** an das **Cytoskelett** weiterzuleiten. Mehrere **Protein-Kinasen**, darunter z.B die Src-Tyrosin-Kinase, sind in Fokalkontakten lokalisiert, und manchen Hinweisen zufolge ändert sich ihre Aktivität in Abhängigkeit von der Unterlage, auf der sich die Zelle befindet. Diese Kinasen können verschiedene Zielproteine phosphorylieren, unter anderem auch Bestandteile des Cytoskeletts; deshalb regulieren sie das **Überleben**, das **Wachstum**, die **Morphologie**, die **Bewegung** und die **Differenzierung** von Zellen als Reaktion auf die umgebende extrazelluläre Matrix. Bestimmte Defekte in Genen für einzelne Proteine in den Fokalkontakten oder ihren assoziierten Kinasen sind in vielen Krebserkrankungen gefunden worden.

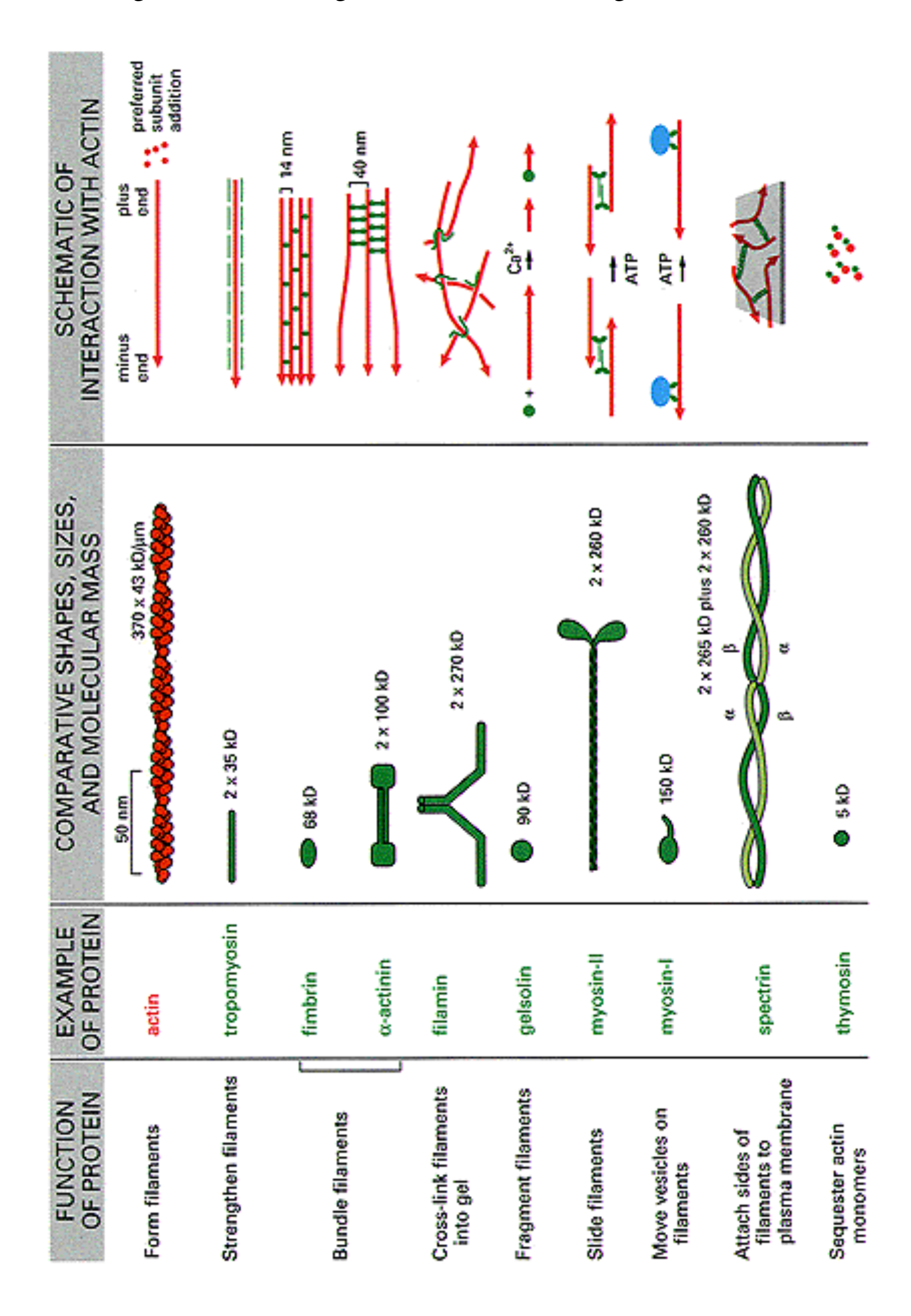
Wie die beschriebenen Beispiele zeigen, kann dasselbe Actin-Filament an verschiedenen Stellen der Zellrinde mit unterschiedlichen Actin-bindenden Proteinen in Wechselwirkung treten, und die Actin-bindenden Proteine können sich auf verschiedene Bereiche in der Zelle aufteilen. Was verhindert, daß die einzelnen Gruppen Actin-bindender Proteine sich im Cytoplasma vermischen? Höchstwahrscheinlich sind dafür sowohl **kooperative** als auch **kompetitive Wechselwirkungen** zwischen diesen Proteinen von Bedeutung. Die Actin-bindenden Proteine einer bisher noch nicht erwähnten Klasse heften sich zum Beispiel seitlich an die Actin-Filamente. Die häufigsten Proteine dieser Gruppe sind die **Tropomyosine**; starre, stäbchenförmige Proteinmoleküle, die ihren Namen der Tatsache verdanken, daß sie ein ähnliches Röntgenbeugungsmuster erzeugen wie Myosin-II. Wie der Schwanz von Myosin-II, so ist auch Tropomyosin **ein Dimer aus zwei gleichartigen α-Helices**, die sich als Doppelwendel umeinander winden. Tropomyosin bindet auf der gesamten Länge eines Actin-Filaments, das es auf diese Weise stabilisiert und versteift. Es **verhindert** auch die Bindung von **Filamin** an die **Actin-Filamente**, und das ist möglicherweise eine Erklärung, weshalb Tropomyosin und Filamin in der Regel in den Zellen unterschiedlich verteilt sind. Andererseits verstärkt die Bindung des Tropomyosins die Anheftung von Myosin-II an das Actin-Filament - ein Beispiel für eine **kooperative Wechselwirkung**.



099: Filamin und Tropomyosin: Kreuzvernetzung oder Bündelung

Damit wird nach und nach deutlich, wie Streßfasern und das Geflecht der Actin-Filamente in der Zellrinde in demselben Cytoplasma nebeneinander bestehen können. An einer Stelle der Zelle, ausgehend vielleicht von einem entstehenden Fokalkontakt unter dem Einfluß eines aktivierten Rho-Proteins, verbinden sich Tropomyosin, Myosin-II und α-Actinin mit den Actin-Filamenten, wobei Filamin ferngehalten wird; die Kontraktionstätigkeit von Myosin-II fördert dann weitere Strukturveränderungen, so daß eine Streßfaser entsteht. An einer anderen Stelle in der Zelle binden Actin-Filamente, denen Tropomyosin fehlt, das Filamin, und es bildet sich ein lockeres Geflecht, in dem α-Actinin nur an wenigen Stellen zwei Filamente gleichzeitig binden kann, so daß es ferngehalten wird; die Krümmung der Filamente in einem solchen lockeren Maschenwerk dürfte auch die Bindung von Tropomyosin erschweren, denn dieses Molekül bevorzugt ein gestrecktes Filament. Dieses Bild ist zwar zum Teil noch Spekulation, aber es zeigt das Grundprinzip: eine Kombination aus kooperativen und kompetitiven Wechselwirkungen kann in einem gemeinsamen Cytoplasma räumlich unterschiedliche Filament-Anordnungen entstehen lassen. Wie die räumlichen Unterschiede, welche die Bildung dieser Ansammlungen auslösen, ursprünglich entstehen, ist nicht bekannt, und man weiß auch nicht, wieviele verschiedene Anordnungen der Actin-Filamente in derselben Zelle nebeneinander bestehen können, aber es sind sicher mehr als die zwei, die gerade beschrieben wurden.

Einige Actin-bindende Protein, die bereits beschrieben wurden, sind in der folgenden Abbildung zusammenfassend dargestellt.



100: Klassen von Actin-bindenden Proteinen

• *Zellzyklus*

Zellen vermehren sich, indem sie lebenswichtige Komponenten verdoppeln und sich anschließend teilen. Dieser **Zellteilungszyklus** ist grundsätzlich der Weg, auf dem sich alle Lebewesen vermehren.

Bei vielzelligen Arten sind viele Zellteilungszyklen nötig, damit ein neues Individuum entsteht. Auch wenn diese Organismen das Erwachsenenstadium erreicht haben, ist Zellteilung weiterhin erforderlich, damit die durch natürlichen Verschleiß oder programmierten Zelltod (**Apoptose**) verlorengehenden Zellen ersetzt werden. Daher müssen in einem erwachsenen Menschen in jeder Sekunde viele Millionen neuer Zellen entstehen, um den Ist-Zustand zu erhalten. Kommt die Zellteilung vollständig zum Stillstand, zum Beispiel durch eine hohe Dosis ionisierender Strahlung, wird das betroffene Individuum innerhalb weniger Tage sterben.

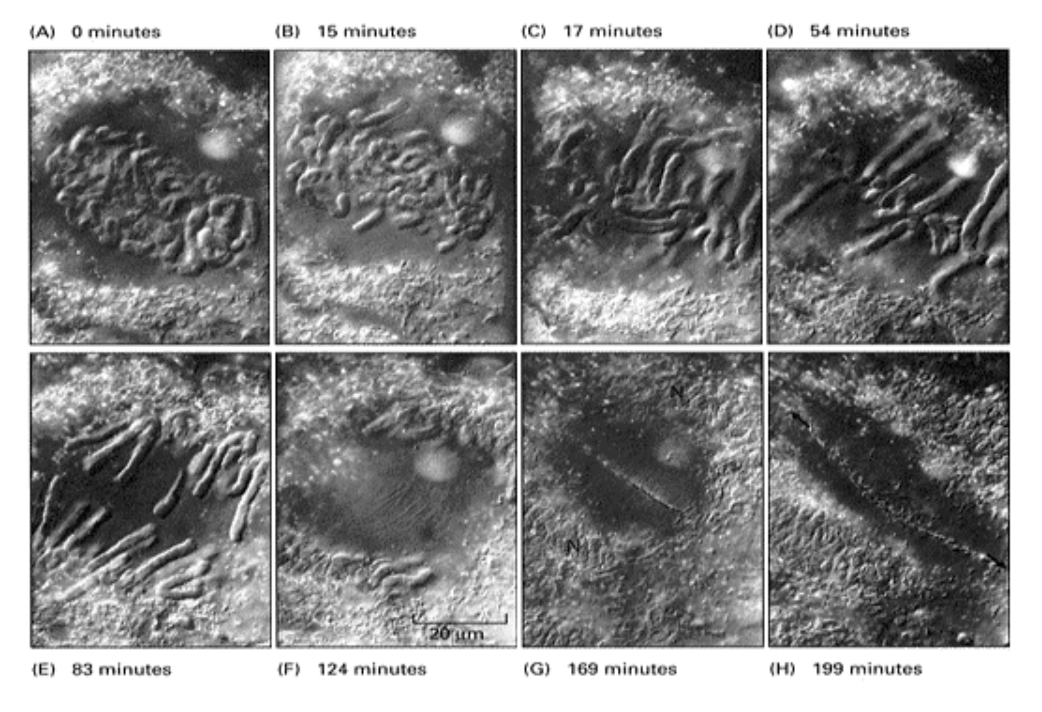
Um ein Paar genetisch identischer Tochterzellen zu erhalten, muß zunächst die DNA getreulich verdoppelt und die replizierten Chromosomen in zwei einzelne Zellen aufgeteilt werden. Der Zellteilungszyklus garantiert spezifische Vorgänge, um diese Aufgaben zu erfüllen. Die große Mehrheit der Zellen verdoppelt in jedem Zellzyklus auch ihre **Masse** und ihre **cytoplasmatischen Organellen**. Daher muß während des Zellzyklus ein Komplex von cytoplasmatischen und Zellkern-spezifischen Prozessen miteinander koordiniert werden. Die Klärung der Frage, wie diese Koordination erreicht wird, ist ein zentrales Problem.

Unser Verständnis der Zellteilung hat sich in den letzten Jahren völlig gewandelt. In der Vergangenheit wurde der Zellzyklus verfolgt, indem z.B. mit einem Lichtmikroskop die **Chromosomen-Trennung** beobachtet wurde, oder durch Messung der Einbauraten eines radioaktiven Vorläufers in die DNA die **DNA-Replikation** quantifiziert wurde. Das Hauptinteresse lag daher auf den Chromosomen, und dort schienen große Unterschiede zwischen den Zellzyklen verschiedener Organismen und verschiedener Arten von Zellen zu bestehen.

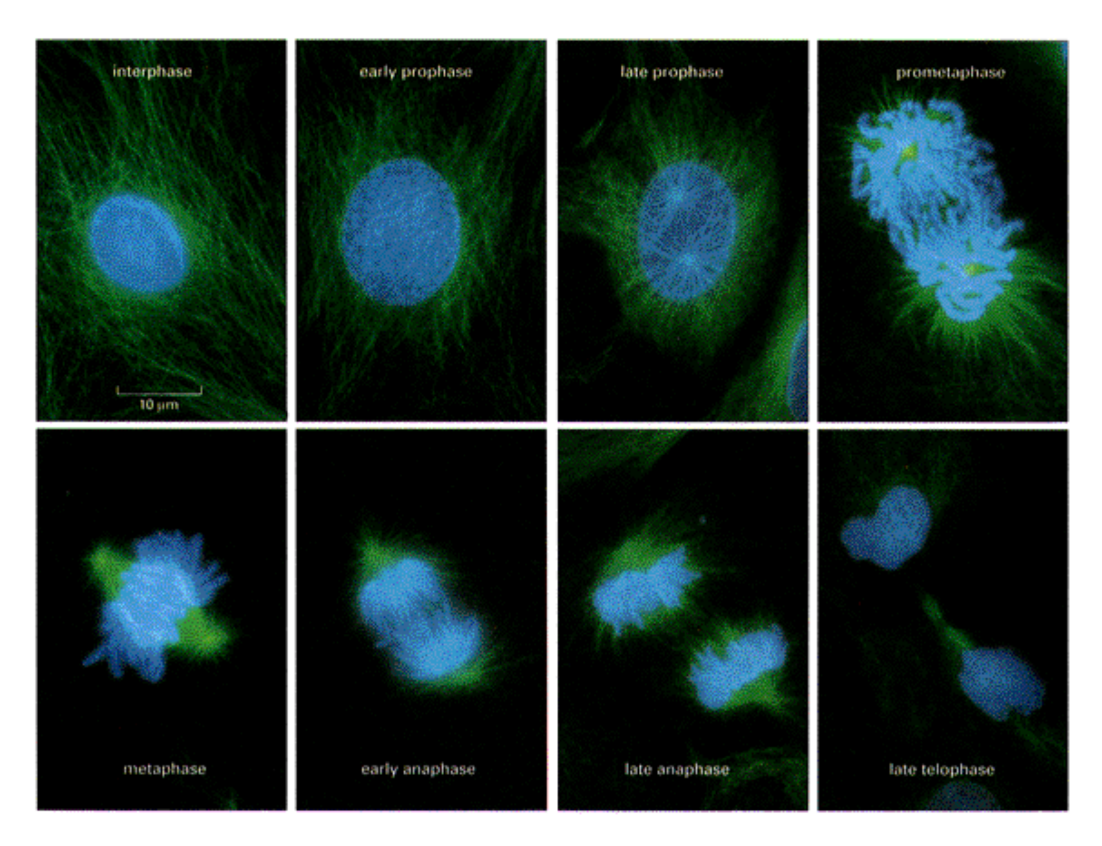
Jüngste Experimente haben eine neue und einfachere Betrachtungsweise geliefert, wonach der Zyklus als Einheit durch ein Zellzyklus-Kontrollsystem koordiniert wird. Die Proteine dieses Systems tauchten zuerst vor mehr als einer Milliarden Jahren auf und wurden während der Evolution so gut konserviert, daß sie nach einer Übertragung von menschlichen Genen in die Hefe immer noch perfekt funktionieren. Daher kann man das Kontrollsystem in einer Vielzahl von Eukaryonten untersuchen und alle Erkenntnisse zu einem einheitlichen Bild von Zellwachstum und Zellteilung vereinen.

Die **Dauer eines Zellzyklus** ist von Zelltyp zu Zelltyp sehr verschieden. Embryonen von Fliegen haben die kürzesten bekannten Zellzyklen, welcher ungefähr **8 Minuten** dauert. Der Zellzyklus von Leberzellen aus einem Säuger kann **länger als ein Jahr dauern**. Wir beginnen jedoch mit einem typischeren Beispiel, um den Ablauf der Ereignisse in einer sich ziemlich schnell teilenden Säugerzelle (der Zyklus benötigt ungefähr 24 Stunden) zu beschreiben.

Der Zellzyklus ist gewöhnlich in mehrere, unterschiedliche Phasen unterteilt, von denen die **Mitose-Phase**, der Prozeß der Kernteilung, den beeindruckendsten Abschnitt darstellt, der zur eigentlichen Zellteilung führt:



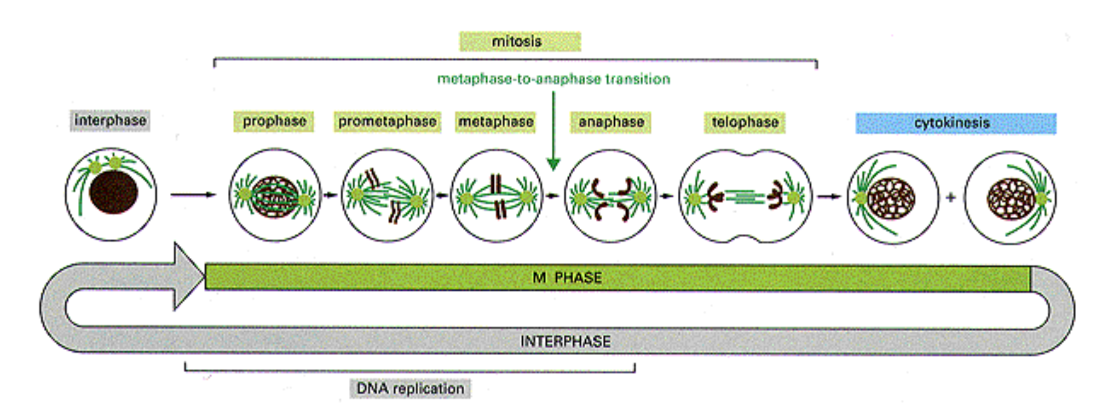
101: Phasenkontrastaufnahmen einer sich teilenden Zelle



102: DAPI- und Antikörper-Färbung einer sich teilenden Zelle

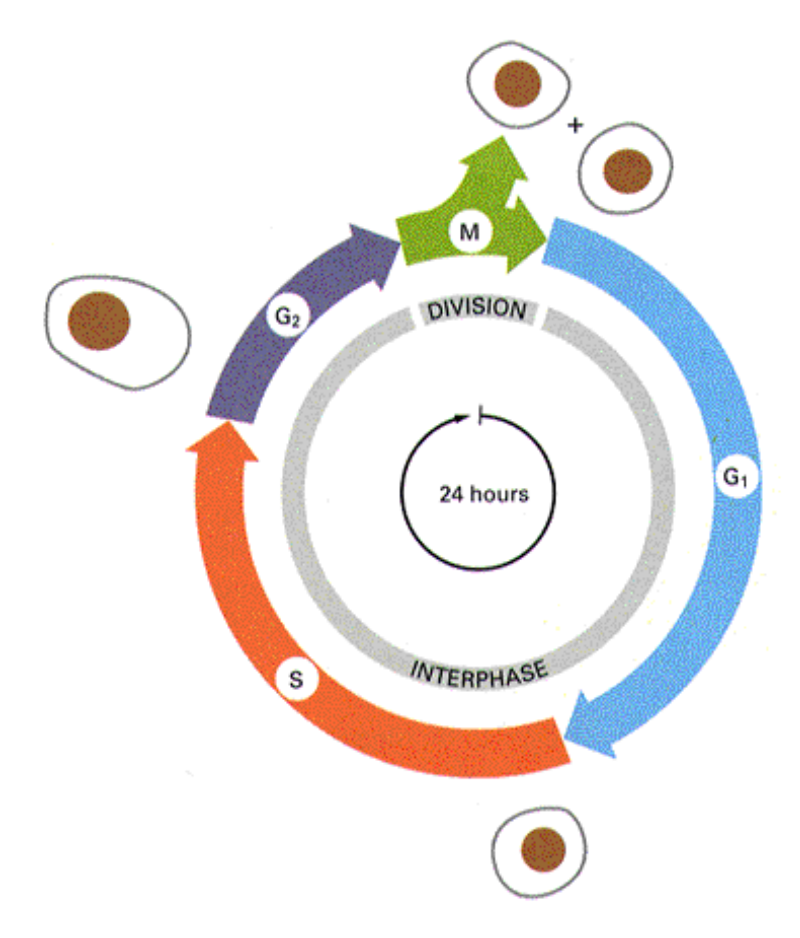
Während der Mitose zerfällt die Kernmembran, der Inhalt des Zellkerns kondensiert zu sichtbaren Chromosomen, und zelluläre Mikrotubuli bilden die **Mitosespindel**, die schließlich die Chromosomen trennt. Während die Mitose weiter fortläuft, scheint die Zelle kurz in einem als **Metaphase** bezeichneten Stadium zu verharren, in welchem die bereits verdoppelten Chromosomen an der Mitosespindel aufgereiht werden und auf ihre Trennung warten. Die Trennung der verdoppelten Chromosomen markiert den Beginn der **Anaphase**, in der sich die Chromosomen zu den jeweiligen Polen der Spindel hin bewegen, wo sie dekondensieren und neue, intakte Zellkerne bilden. Anschließend, in der **Cytokinese**, teilt sich die Zelle in zwei Tochterzellen, was traditionell als das Ende der Mitose-Phase oder Mitose-Phase des Zellzyklus betrachtet wird. In den meisten Zellen dauert die Mitose-Phase insgesamt etwa eine Stunde, was nur einen kleinen Teil der vollen Zyklus-Zeit ausmacht. Den viel längeren Zeitabschnitt zwischen einer Mitose-Phase und der nächsten bezeichnet man als **Interphase**. Sie erscheint unter dem Mikroskop - irreführenderweise - als ereignislose Unterbrechung,

in der die Zelle einfach nur an Größe zunimmt. Wie sich jedoch mit anderen Untersuchungsmethoden zeigte, stellt die Interphase einen geschäftigen Abschnitt in der sich teilenden Zelle dar, in der fein abgestimmte Vorbereitungen für die Zellteilung in genau festgelegter Reihenfolge ablaufen. Speziell in der Interphase erfolgt die Replikation der DNA des Zellkerns.



103: Zellzyklus, orientiert an der Mitose-Phase

Die DNA im Zellkern wird meist nur in einem begrenzten Abschnitt der Interphase repliziert, der als **S-Phase** des Zellzyklus bezeichnet wird. Zwischen dem Ende der Mitose-Phase und dem Beginn der DNA-Synthese vergeht gewöhnlich einige Zeit, die sogenannte G1-Phase. Den Zeitabschnitt zwischen dem Ende der DNA-Synthese und dem Beginn der nächsten Mitose nennt man die G2-Phase. Gl und G2 geben zusätzliche Zeit zum Wachstum: wäre die Interphase gerade so lang wie die DNA-Replikation, hätte die Zelle nicht genügend Zeit, um ihre Masse vor der Teilung zu verdoppeln. Im Verlauf der Gl-Phase prüft die Zelle ihre Umgebung und ihre eigene Größe, um zur geeigneten Zeit den entscheidenden Schritt zur DNA-Replikation und Vollendung des Teilungszyklus zu machen. Die G2-Phase stellt eine Sicherheits-Pause dar, in der die Zelle sich vergewissert, ob die DNA-Replikation vollständig abgeschlossen wurde, bevor sie in die Mitose eintritt. Gl-, S-, G2- und Mitose-Phase sind traditionell Unterabschnitte des Standard-Zellzyklus.



104: Schematische Darstellung des Zellzyklus

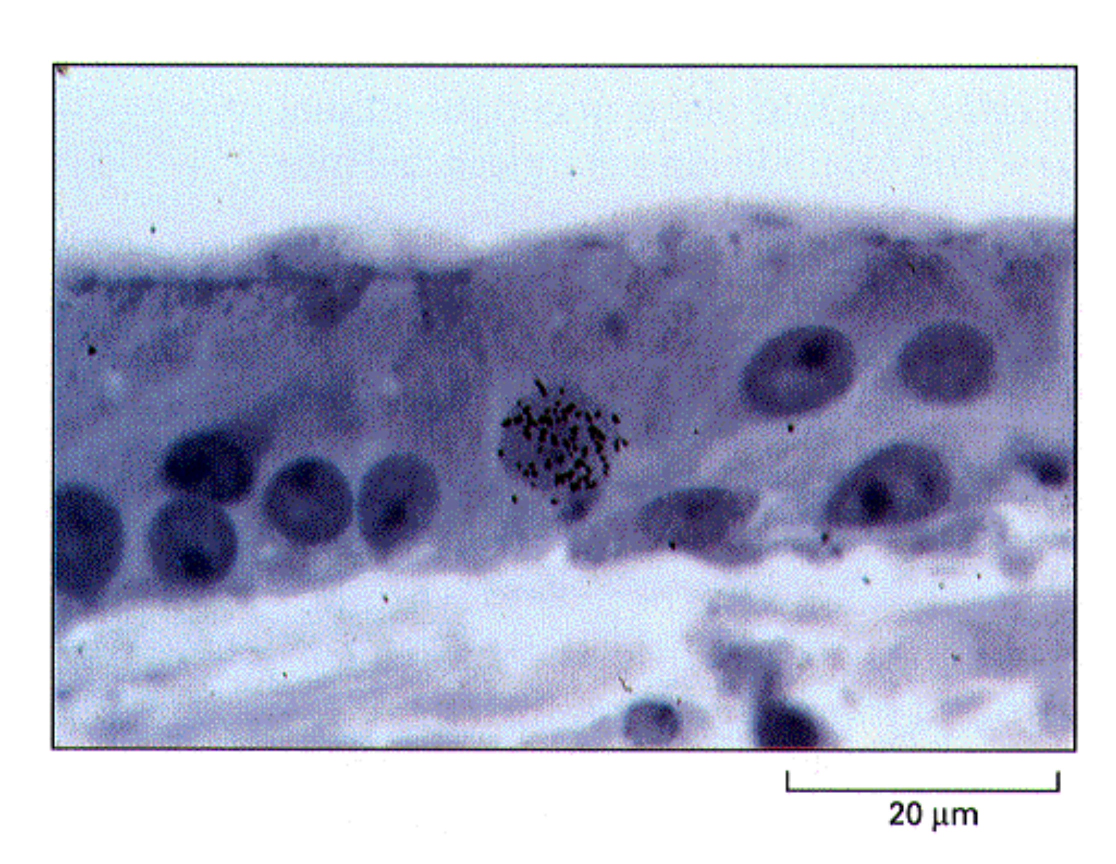
Da die Zellen vor ihrer Teilung Zeit zum Wachstum benötigen, ist der Standard-Zellzyklus im allgemeinen sehr lang - 12 Stunden oder länger für die meisten wachsenden Gewebe eines Säugers. Obwohl die Dauer aller Phasen des Zyklus in bestimmten Grenzen variieren können, treten doch bei den meisten gewöhnlich untersuchten Zelltypen die größten Unterschiede in der Dauer der Gl-Phase auf.

Zellen in Gl-Phase können, sofern sie noch nicht zur DNA-Replikation übergegangen sind, den Zyklus stoppen und in ein bestimmtes Ruhestadium gelangen, oft G0-Phase genannt, in dem sie für Tage, Wochen oder sogar Jahre bleiben können, bevor sie die Vermehrung fortsetzen.

Den kürzesten aller Zellteilungzyklen in Eukaryonten - sogar kürzer als die vieler Bakterien - haben frühe embryonale Zellzyklen, die in Embryonen bestimmter Tiere sofort nach der Befruchtung auftreten und

so schnell wie möglich eine riesige Eizelle in viele kleinere Zellen unterteilen. In diesen Zyklen erfolgt kein Größenwachstum, die Gl- und G2-Phasen sind drastisch verkürzt, und die Zeitspanne von einer Zellteilung zur nächsten beträgt zwischen 8 und 60 Minuten.

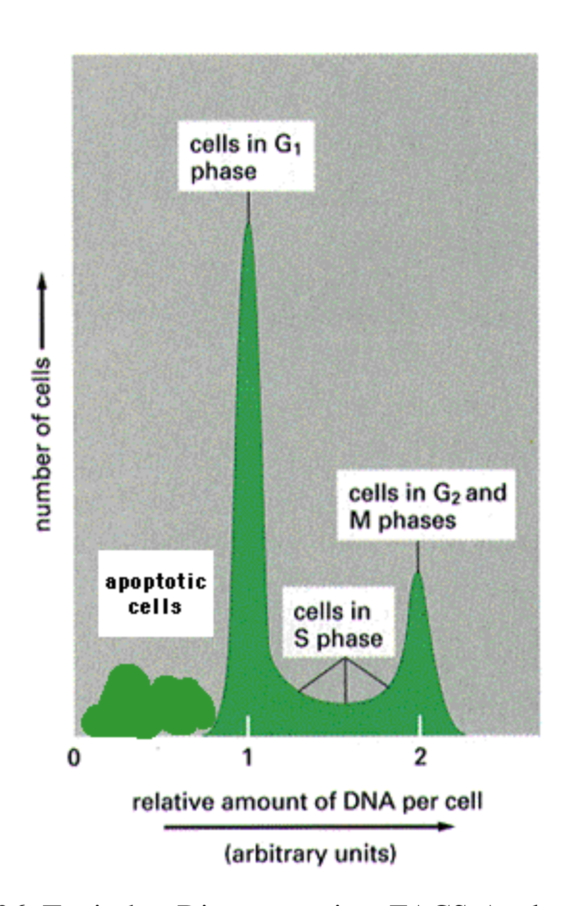
Wie kann man nun feststellen, in welchem Abschnitt des Zyklus sich eine Zelle befindet? Zellen in der S-Phase werden identifiziert, indem sie mit **markierten Thymidin-Molekülen** versorgt werden, einem Baustein, der von Zellen ausschließlich zur DNA-Synthese verwendet wird. Die Markierung kann radioaktiv, meist in der Form von **[3H]-Thymidin** oder chemisch, gewöhnlich in der Form von **Bromdeoxy-uridin** (BrdU), einem synthetischen Thymidin-Analogon, sein. Zellkerne, die den markierten Baustein aufgenommen haben, werden durch Autoradiographie oder durch Markierung mit einem anti-BrdU-Antikörper identifiziert.



105: 3H-Thymidin-Einbau: die Photoemulsion wird durch die Anwesenheit der radioaktiven Nukelotide entsprechend geschwärzt

In einer typischen Population von wachsenden Zellen, die sich schnell, aber nicht synchron teilen, befinden sich dann zu jedem Zeitpunkt etwa **30 % der Zellen in der S-Phase** und werden daher durch einen kurzen Impuls von DNA-Vorläufer-Molekülen markiert.

Eine weitere Möglichkeit festzustellen, in welcher Phase des Zyklus sich eine Zelle gerade befindet, ist die **Bestimmung ihres DNA-Gehalts**, der sich ja während der S-Phase verdoppelt. Dieses Verfahren beruht auf der Verwendung eines fluoreszenzaktivierten Zellsortierers (FACS) und der Markierung der DNA mit Propidium-Iodid. Man kann im FACS sehr leicht große Zellzahlen automatisch analysieren. Die Anzahl der Zellen in den einzelnen Phasen kann man durch die Integration der einzelnen Peaks der G1-, S- und G2- und Mitose-Phasen bestimmen.



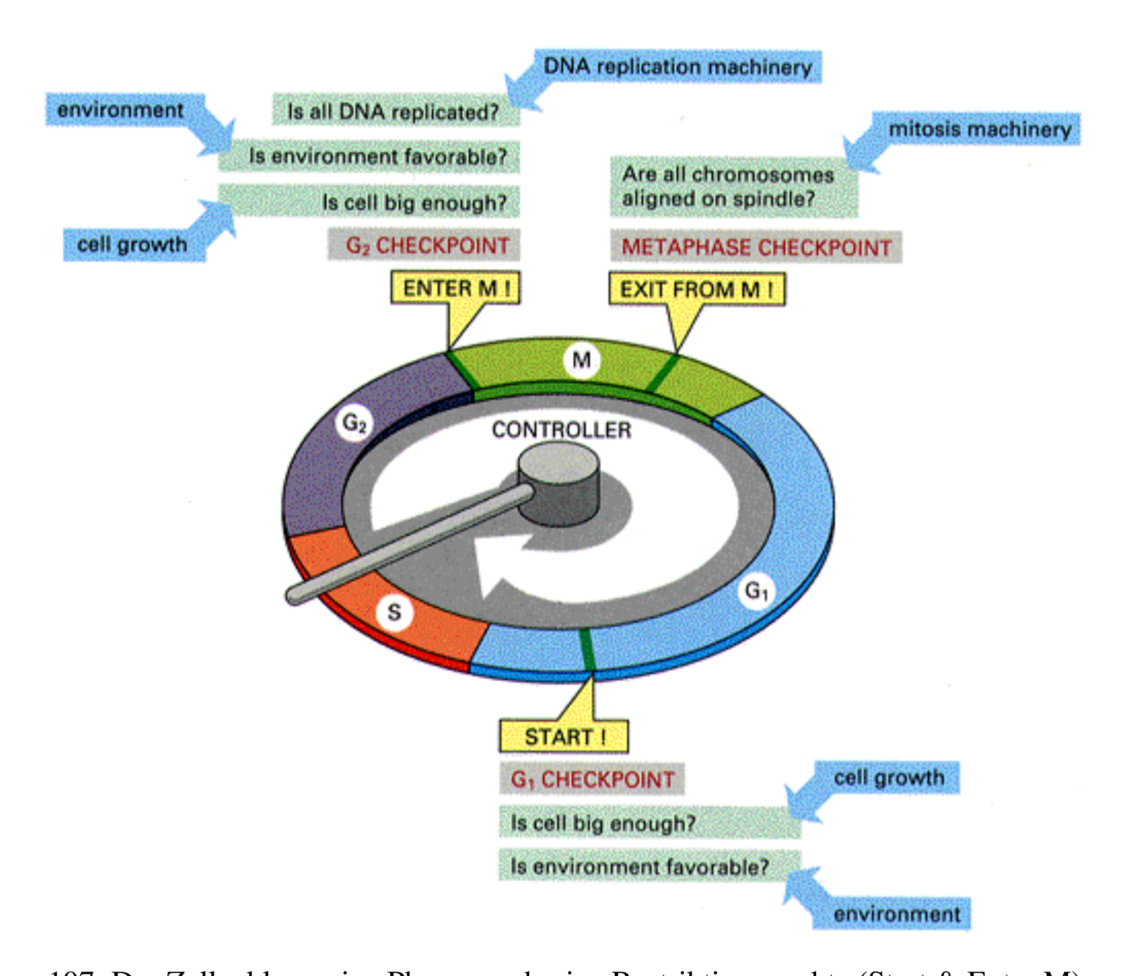
106: Typisches Diagramm einer FACS-Analyse

Unter günstigen Wachstumsbedingungen steigt der Proteingehalt einer normalen Zelle während eines Zyklus mehr oder weniger kontinuierlich an. Entsprechend gleichmäßig verläuft auch die RNA-Synthese, außer während der Mitose-Phase, in der die Chromosomen offensichtlich zu stark kondensiert sind, als daß Transkription stattfinden kann. Wird das Synthese-Schema einzelner Proteine untersucht, stellt sich heraus, daß die allermeisten Proteine während des gesamten Zellzyklus gebildet werden. Für die meisten Zellbestandteile ist Wachstum also ein stetiger, kontinuierlicher Prozeß, der nur kurz in der Mitose-Phase durch die Zweiteilung des Kerns und dann der ganzen Zelle unterbrochen wird.

Vor diesem Hintergrund des kontinuierlichen Wachstums spielen sich jedoch nicht nur einzelne Prozesse wie DNA-Synthese und die sichtbaren Ereignisse der Mitose ab. Beispielsweise muß zur Vorbereitung der Mitose das Centrosom verdoppelt werden, um die beiden Pole der mitotischen Spindel zu bilden. Ebenso erfolgt in einem bestimmten Stadium des Zellzyklus die Synthese großer Mengen einiger weniger **Schlüsselproteine**. Die **Histone** zum Beispiel, die für den Aufbau von neuem Chromatin gebraucht werden, entstehen nur **in der S-Phase** in großen Mengen; das gleiche gilt auch für einige andere Enzyme, die Desoxyribonucleotide herstellen und die DNA replizieren.

Der **Zellzyklus** funktioniert im Wesentlichen wie eine automatische Maschine. Ein zentrales Kontrollelement löst bestimmte Vorgänge nach in einer bestimmten Abfolge aus. Dieses Kontrollelement kann prinzipiell wie eine **einfache Uhr** funktionieren, die jedem Schritt eine festgelegte Zeit zuweist. Zusätzlich erfolgt an bestimmten kritischen Punkten des Zellzyklus eine Rückmeldung über den erfolgreichen Ablauf spezifischer Vorgänge.
Die Trennung zwischen Kontrollsystem und den ausführenden Proteinen im Zellzyklus war bis vor kurzem noch völlig unbekannt. Bisher galt die Meinung, jeder der wichtigeren Vorgänge würde, wie in einer Reihe umfallender Dominosteine, in irgendeiner Weise direkt den nächsten Vorgang auslösen. Der Umkehrpunkt im Verständnis kam mit der Identifizierung von Schlüsselkomponenten des Zellzyklus-Kontrollsystems, den sogenannten **Cyclinen** und **Cyclin-Kinasen**.

Das **Kontrollsystem des Zellzyklus** ist eine **periodisch ablaufende**, biochemische Vorrichtung aus einer Reihe sich gegenseitig beeinflussender Proteine. Sie veranlassen und steuern die wesentlichen nachgeordneten („*downstream*") Prozesse, die für Verdopplung und Teilung des Zellinhalts verantwortlich sind. Im normalen Zellzyklus wird das Kontollsystem durch Bremsen reguliert, die den Zyklus an bestimmten **Restriktionspunkten** anhalten können. Hier können Rückkopplungssignale Information über die nachgeordneten Prozesse mitteilen und so das Fortschreiten des Kontrollsystems selbst hinauszögern oder es vom Auslösen des nachfolgenden Prozesses abhalten, bis der vorherige beendet ist.



107: Der Zellzyklus, seine Phasen und seine Restriktionspunkte (Start & Enter M)

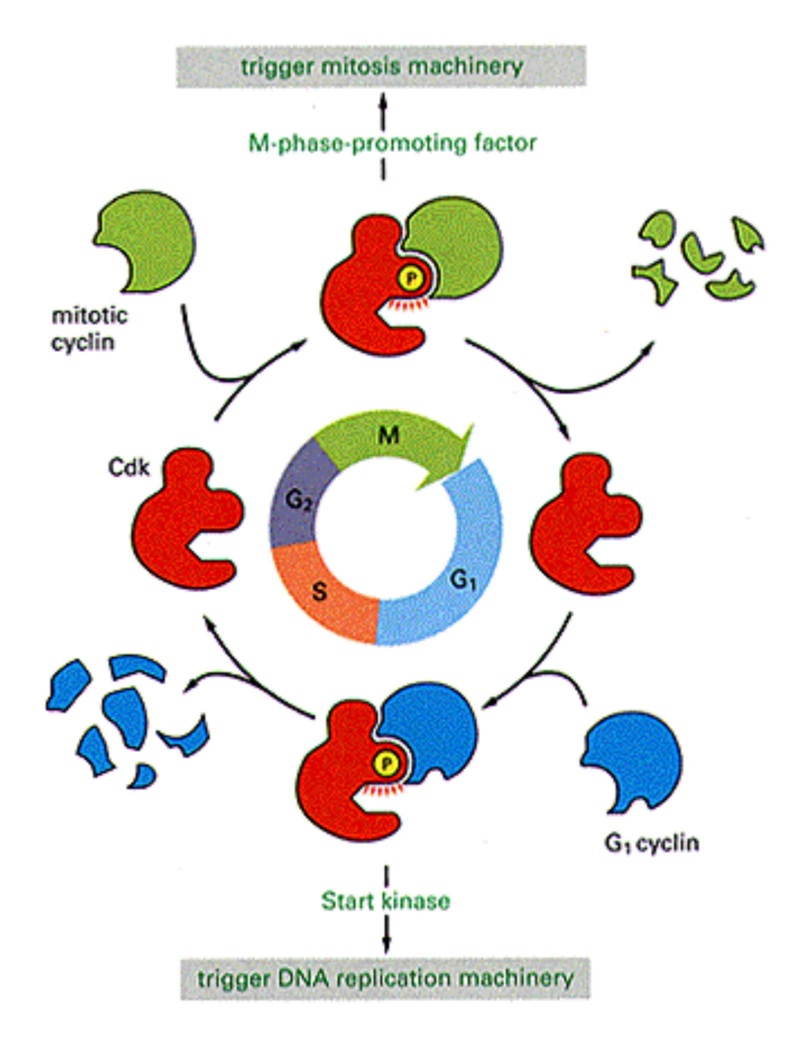
Die **Bremsmechanismen** sind noch auf eine andere Weise wichtig: sie erlauben dem Zellzyklus-Kontrollsystem auf Signale aus der Umgebung zu reagieren. Diese Milieu-abhängigen Mechanismen beeinflußen grundsätzlich das Kontrollsystem an einem der beiden wichtigsten

Restriktionspunkten des Zykluses - der eine liegt in der Gl-Phase kurz vor dem Übergang in die S-Phase, der andere in der G2-Phase vor der Einleitung der Mitose. Gewöhnlich werden die Zellen höherer Eukaryonten am Kontrollpunkt der Gl-Phase im Zyklus angehalten. Dieser Punkt wird in Hefen als **START** bezeichnet, während er in Säugerzellen einfach **Gl-Restriktionspunkt** genannt wird. Verbieten die Umstände eine Zellteilung, kommt bei vielen Zellen der Zyklus an dieser Stelle zum Stillstand. Im Zyklus einer sich kontinuierlich teilenden Zelle stellt der G1-Restriktionspunkt den Punkt dar, an dem das Kontrollsystem den Vorgang auslöst, der die S-Phase einleitet. Der Beginn der Mitose erfolgt am Restriktionspunkt in der G2-Phase.

Aus historischen Gründen war das meiste über den Mechanismus des Kontrollsystems aus Untersuchungen des G2-Restriktionspunkts am Übergang zur Mitose bekannt.

Das Kontrollsystem des Zellzyklus beruht auf zwei Familien von Schlüsselproteinen. Die erste ist die Familie der **Cyclin-abhängigen Proteinkinasen** (**Cdk**), die nachgeordnete Prozesse durch die Phosphorylierung bestimmter Proteine an **Serin-** und **Threonin-Resten** auslösen. Die zweite ist eine Familie spezialisierter Aktivierungsproteine, sogenannt **Cycline**, die an Cdk-Moleküle binden und ihre Fähigkeit, entsprechende Zielproteine zu phosphorylieren, kontrollieren.

Die periodische Zusammenlagerung, Aktivierung und das Auseinandergehen von **Cyclin-Cdk-Komplexen** sind die zentralen Ereignisse, die den Zellzyklus am Laufen halten. Cycline werden sie genannt, weil sie bei jeder Zellteilung einem Kreislauf von Synthese und Abbau unterworfen sind. Es gibt zwei Hauptklassen von Cyclinen: **mitotische Cycline**, die während der G2-Phase an Cdk-Moleküle binden und für den Beginn der Mitose benötigt werden, und **G1-Phase-Cycline**, die in der G0-Phase an Cdk-Moleküle ankoppeln und für den Übergang zur S-Phase zuständig sind. In Hefezellen, die bei der Aufklärung des Zellzyklus eine wesentliche Rolle gespielt haben, vermittelt das gleiche Mitglied der Cdk-Familie an beiden Restriktionspunkten die Kinase-Aktivität; in Säugerzellen gibt es wenigstens zwei verschiedene Cdk-Proteine, eins für jeden Restriktionspunkt.



108: Zellzyklus-kontrollierende Proteine in der Hefe: Cdk und zwei Cycline

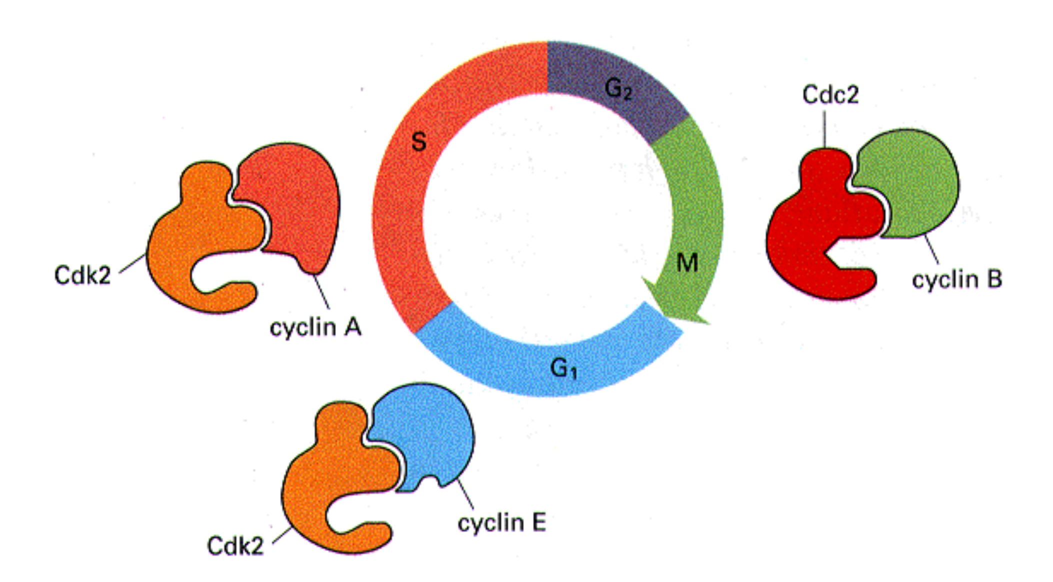
für die Hefe gilt:
Mitotisches Cyclin reichert sich während der G2-Phase nach und nach an, bindet an Cdk-Moleküle und bildet einen als Mitose-Phase-Förderfaktor (**MPF**) bezeichneten Komplex. Dieses Gebilde ist zunächst inaktiv, wird jedoch durch andere Enzyme, die es phosphorylieren und dephosphorylieren, in seinen aktiven Zustand überführt. Die letzte Aktivierung wird durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus ausgelöst und treibt die Zelle in die Mitose. Ebenso plötzlich wird MPF durch den Abbau von mitotischem Cyclin an der Grenze zwischen Metaphase und Anaphase inaktiviert, wodurch es der Zelle möglich wird, die Mitose zu beenden.

In tierischen Zellen haben wir eine etwas andere Situation. Die meisten Zellen eines adulten Organismus wachsen oder teilen sich nicht, sondern befinden sich in einem Ruhezustand, in dem sie ihre speziellen Funktionen ausführen und nicht dem Teilungszyklus unterliegen. Obwohl in den Körpergeweben Nährstoffe im Überfluß vorhanden sind, werden die Zellen an ihrer Vermehrung gehindert.

Nährstoffe allein sind für einzelne Zellen eines Vielzellers nicht ausreichend, um wachsen und sich teilen zu können. Dazu braucht eine Zelle spezifische Signale von anderen Zellen. Viele dieser Signale sind Proteine, die als **Wachstumsfaktoren** bezeichnet werden: sie binden an komplementäre Rezeptoren in der Plasmamembran, und stimulieren die Zellteilung. Diese spezifischen Signale übergehen intrazelluläre, **negative Kontrollmechanismen**, die sonst das Wachstum verhindern und das Fortschreiten des Zellzyklus-Kontrollsystems blockieren.

Das Zellzyklus-Kontrollsystem der meisten vielzelligen Organismen ist weit komplexer aufgebaut als das der Hefen. Gen-Duplikation und Divergenz haben offensichtlich vielfältige Varianten der grundlegenden Gene des Zellzyklus gebildet, die Seite an Seite in einer einzelnen Zelle vorkommen und auf leicht veränderten Weisen arbeiten. Daher benötigen menschliche Zellen **wenigstens zwei** (wahrscheinlich mehr) Cyclin-abhängige Gene für Kinasen. Zwei derartige Gene - ***cdc2*** und ein verwandtes Gen ***cdk2*** - sind auch in Xenopus und Drosophila bekannt; beide kodieren für **Kinasen**, deren Aktivierung von ihrer Bindung an Cycline abhängt.

Gleich den Hefen besitzen höhere Tiere viele Cycline: bis jetzt wurden wenigstens sechs Arten gefunden, die als **Cyclin A, B, C, D, E und F** bezeichnet wurden; einige dieser Cycline sind selbst Familien von eng verwandten Molekülen. Der Komplex aus **Cdk2** und **Cyclin E** ist notwendig, um den Restriktionspunkt in der G1-Phase zu überschreiten. **Cdk2** und **Cyclin A** sind zur Aktivierung des DNA-Replikationssystems nötig. Die **Einleitung der Mitose** in Wirbeltierzellen hängt von der Interaktion des **Cdc2**-Proteins mit **Cyclin B** ab.



109: In Säugerzellen werden verschiedene Cycline in Kombination mit Cdk2 verwendet

Zellen, die ständig den Zellzyklus durchlaufen, enthalten zu verschiedenen Zeiten des Zyklus ansteigende und abfallende Konzentrationen der unterschiedlichen Cycline. Neben diesen Cyclinen und ihren spezifischen Cyclinkinasen spielen **extrazelluläre Signale** eine wichtige Rolle für Säugerzellen. Viele Jahrzehnte schlugen alle Versuche fehl, die minimalen Bedingungen für die Zell-Proliferation zu finden; sogar in einem Medium, das alle offensichtlich chemisch festgelegten Nährstoffe, einschließlich Glucose, Aminosäuren und Vitaminen enthielt, wuchsen die Zellen nur, wenn das Medium zusätzlich mit **Blut-Serum** (Serum) versehen wurde.

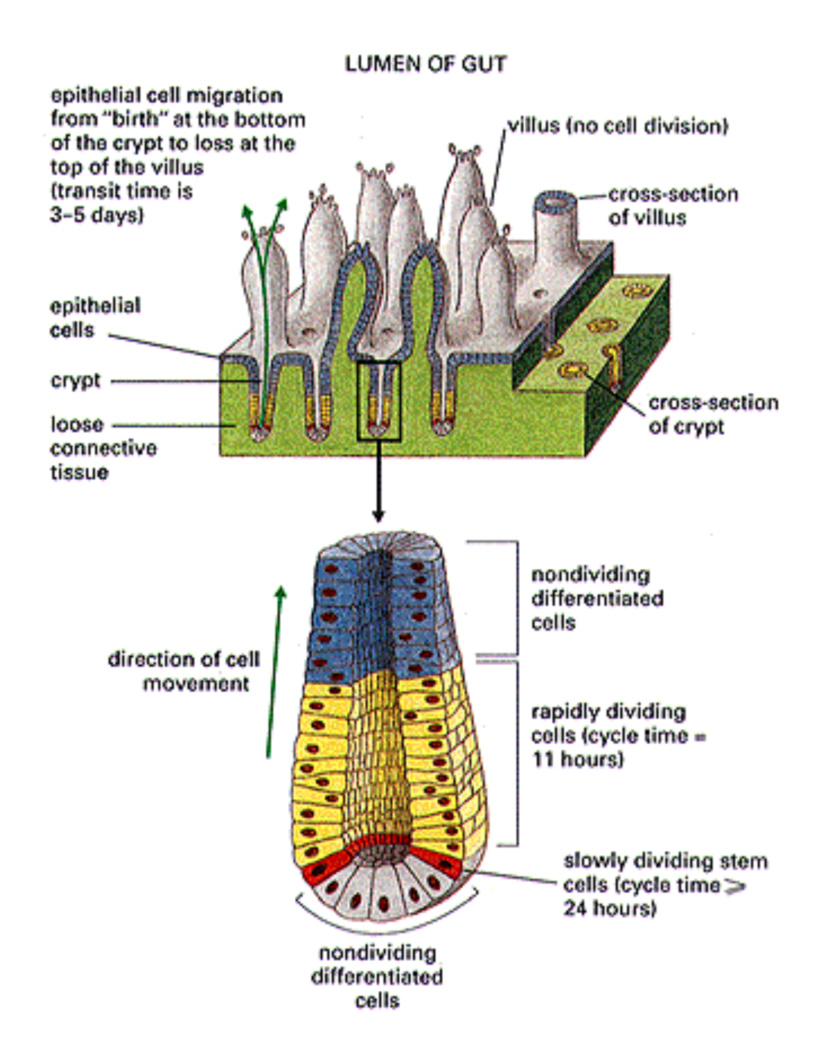
Säugerzellen reagieren auf die Abwesenheit von **Serum** mit einem Wachstumsstop, und die Zellen arretieren in der G0-Phase. Es konnte gezeigt werden, daß die wesentlichen Faktoren, die durch das Serum geliefert werden, hochspezifische Proteine, sogenannte **Wachstumsfaktoren**, sind, die meist in nur sehr geringen Konzentrationen benötigt werden (in der Größenordnung von 10^{-9} bis 10^{-11} mol/L). Einer der zuerst identifizierten Faktoren war der *platelet-derived growth factor* (**PDGF**), der für viele andere seitdem entdeckten extrazellulären Faktoren typisch ist. Im Körper spielt das aus Blutplättchen freigesetzte PDGF vermutlich eine wichtige Rolle bei der Stimulierung der Zellteilung (sowie weiterer Prozesse) während der Wundheilung.

PDGF ist nur einer von über 50 bekannten Proteinen, die als Wachstumsfaktoren arbeiten. Für jeden Typ von Wachstumsfaktor gibt es einen **spezifischen Rezeptor** oder eine **Kombination von Rezeptoren**, die man bei einigen Zellen auf ihrer Oberfläche findet. Zellen sprechen nur auf einen bestimmten Protein-Wachstumsfaktor an, wenn sie das entsprechende Rezeptor-Protein für diesen Faktor in ihrer Plasmamembran enthalten. Neben den Proteinen können auch andere Molekül-Klassen als Wachtumsfaktoren dienen, wie zum Beispiel **Steroide**, die als **intrazelluläre Rezeptorproteine** arbeiten. Wachstumsfaktoren werden in **weit-** und **eng-spezifizierte** Klassen eingeteilt. Weitspezifizierte Faktoren, wie der PDGF und der Epidermis-Wachstumsfaktor (EGF) wirken auf viele Zellarten. So reagieren eine Reihe von Zielzellen wie z.B. **Fibroblasten**, **glatte Muskelzellen** und **Neurogliazellen** auf ***PDGF***. EGF wirkt nicht nur auf epidermale Zellen, sondern auf viele andere Zellarten, sowohl epithelialen als auch nicht-epithelialen Ursprungs. Das extreme Gegenteil stellen eng-spezifische Faktoren wie das **Erythropoietin** dar, das nur für die Proliferation der **Vorläufer** von roten Blutkörperchen sorgt.

Die Proliferation der meisten Zellarten eines ganzen Individuums hängt von einer bestimmten Kombination dieser Substanzen ab. Daher können Wachstumsfaktoren in **verschiedenen Kombinationen** selektiv die Proliferation von jeder unterschiedlichen Zellart regulieren.

Obwohl einige Wachstumsfaktoren sich systemisch über den Blutkreislauf ausbreiten, stammen die meisten jedoch von Zellen aus der Umgebung der betroffenen Zelle ab und **wirken lokal** als chemische Signalüberträger. Zusätzlich zu den Wachstumsfaktoren, die die Zellteilung stimulieren, gibt es Substanzen wie einige Mitglieder aus der Familie des transformierenden Wachstumsfaktors ß (**TGF-ß**). Sie wirken auf bestimmte Zielzellen, stimulieren oder hemmen die Teilung bzw. verstärken in einer bestimmten Konzentration und behindern in einer anderen die Proliferation. Tatsächlich haben die meisten Wachstumsfaktoren neben der Regulierung von Zellwachstum und Teilung eine Vielzahl weiterer Aufgaben: sie kontrollieren, in Abhängigkeit von den Begleitumständen, **Vermehrung**, **Überleben**, **Differenzierung**, **Bewegung** oder **Funktion von Zellen**.

Die Dauer der Zellzyklen in Säugerzellen kann erheblich schwanken, beruht aber auf ihrer Fähigkeit, in die G0-Phase eintreten zu können. Im menschlichen Körper, z.B. vermehren sich einige Zellen wie Neuronen und Skelettmuskelzellen überhaupt nicht mehr; andere, wie z.B. Leberzellen, teilen sich normalerweise ein- oder zweimal im Jahr; manche Darmepithelzellen hingegen verdoppeln sich mehr als zweimal am Tag und sorgen so für ständige Erneuerung der Darminnenwand.



110: Regulierte Proliferation und Differenzierung am Beispiel von Darmzotten

In welcher Weise beeinflussen die verschiedenen äußerlichen Einflüsse das Zellinnere und die Zellproliferation? Viele Erkenntnisse auf diesem Gebiet wurden aus Untersuchungen von Krebszellen gewonnen, in denen die Kontrolle der Zellproliferation gestört ist.

Die Analyse genetischer Veränderungen in Krebszellen hat zur Ent-

deckung von einer großen Anzahl an Genen geführt, die für Proteine kodieren, die in die Kontrolle der Zellproliferation eingreifen. Diese Gene kann man grob in die Klasse der **Proliferations-Gene** und **anti-Proliferations-Gene** einteilen. Die Produkte der erstgenannten unterstützen das Zellwachstum sowie die Ausbildung des Kontrollsystems des Zellzyklus und führen die Zelle über den Gl-Restriktionspunkt. Die Produkte der zweiten Gene bewirken die Tätigkeit der Bremsmechanismen, die das Kontrollsystem stoppen. Eine Mutation in einem Proliferations-Gen, die eine vermehrte Expression oder ein überaktives Protein bewirkt, führt schließlich zu der für Krebs charakteristischen übermäßigen Zellvermehrung. Das mutierte Gen wird als **Oncogen** (ein krebsverursachendes Gen) bezeichnet, während das normale Proliferations-Gen zu den **Proto-Oncogenen** gehört. Umgekehrt kann eine Zelle die normalen Proliferationsbeschränkungen umgehen und sich wie eine Krebszelle teilen, wenn in einem anti-Proliferations-Gen eine zur Inaktivierung führende Mutation stattgefunden hat. Daher werden die Anti-Proliferationsgene normaler Zellen häufig als **Tumorsuppressor-Gene** bezeichnet. In einer gewöhnlichen diploiden Zelle müssen typischerweise beide Genkopien eines Tumorsuppressor-Gens fehlen oder inaktiviert werden, um den Verlust der Wachstumskontrolle herbeizuführen (d. h. der mutierte Phänotyp ist **rezessiv**), während nur **eine Kopie** eines Proto-Oncogens genügt, um den gleichen Effekt zu bewirken (d. h. dieser mutierte Phänotyp ist **dominant**).

Der erste Schritt in der Wirkung eines Protein-Wachstumsfaktors besteht in der **Bindung an einen transmembranen Rezeptor** der Zelloberfläche der Zielzelle. Anschließend katalysiert der intrazelluläre Anteil des Rezeptors eine spezifische Reaktion, die als intrazelluläres Signal dient (Einzelheiten werden später im Kapitel “Signal-Transduktion” noch ausführlich besprochen). Vielschichtigkeit entsteht, weil solche Signale grundsätzlich nicht schlichte Geradeaus-Ketten sind, sondern sich verzweigen; dabei werden viele weitere Komponenten aktiviert, die nun alle parallel arbeiten, und somit ein vielfach miteinander verbundenes Signal-Netzwerk entsteht.

Generell kann man folgendes festhalten: Rezeptoren für Wachstumsfaktoren aktivieren in der Regel **intrazelluläre Phosphorylierungs-Kaskaden**, die zu **Veränderungen in der Gen-Expression** führen.

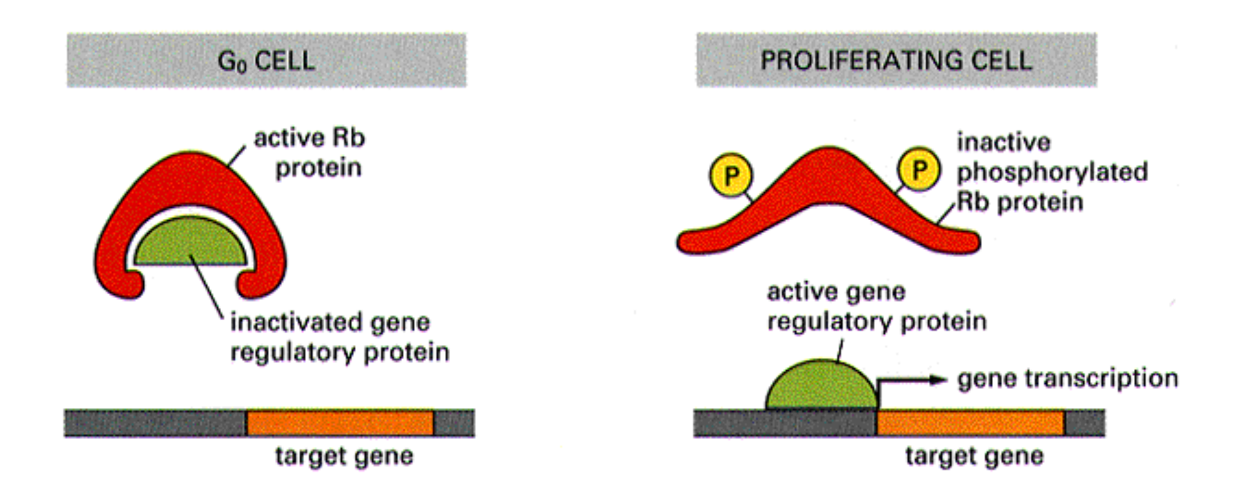
Diejenigen Gene, die durch Wachstumsfaktoren induziert werden, können in zwei Gruppen eingeteilt werden: **Gene für eine frühe Antwort** werden innerhalb von 15 Minuten nach der Behandlung mit Wachstumsfaktoren transkribiert und benötigen nur zelluläre Komponenten, die zu diesem Zeitpunkt auch vorhanden sind (Proteinneusynthese kann durch Cycloheximid blockiert sein). Im Gegensatz hierzu werden **Gene für eine verzögerte Antwort** nicht vor Ablauf von mindestens einer Stunde nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren ausgelöst und sind definitiv auf Proteinneusynthese angewiesen. Es scheint, daß die Gene für die verzögerte Antwort von den Produkten der Gene für die frühe Antwort induziert werden, denn Produkte der frühen Gene sind vielfach als regulatorische Proteine bekannt.

Die am besten untersuchten Gene der frühen Antwort sind die **Myc-**, **Fos-** und **Jun-Proto-Oncogene**. Diese drei Gene kodieren für regulatorische Proteine, die heterodimere Transkriptionsfaktoren bilden (Jun & Fos; Myc & Max). Werden sie in bestimmten Zellen auf Grund von Mutationen vermehrt exprimiert, können sie eine unkontrollierte Proliferation von Zellen verursachen. Besonders Myc spielt eine wesentliche Rolle in der normalen Kontrolle der Zellproliferation: Zellen, in denen die Expression von Myc verhindert wird, durchlaufen auch in Gegenwart von Wachstumsfaktoren keine Zellteilung. Zellen, in denen eine Expression von Myc stattfindet, können nicht in der G0-Phase arretieren. Durch eine künstliche Expression des Myc-Proteins verlassen ruhende Zellen die G0-Phase und beginnen mit der Zellteilung, auch wenn keine Wachstumsfaktoren zugegen sind - ein Verhalten, das schließlich zum programmierten Zelltod (Apoptose) führt.

Unter den Produkten der verzögerten Antwort finden sich einige wichtige Bestandteile des Zellzyklus-Kontrollsystems, einschließlich der Cdk-Proteine und die verschiedenen Cycline, die, vom Zeitpunkt ihrer Expression aus betrachtet, vermutlich mit den Cdk-Proteinen an der

Passage der Zellen über den Gl-Restriktionspunkt, an der Einleitung der S-Phase oder beiden beteiligt sind.

Das am besten untersuchte anti-Proliferations-Gen ist das Retinoblastom-(**Rb**)-Gen. Dieses Gen wurde ursprünglich durch Untersuchungen einer vererbten Veranlagung für einen seltenen Krebs entdeckt, der in den Augen von Kindern auftritt. Der Verlust beider Kopien dieses Gens führt zu einer übermäßigen Zellvermehrung in der unausgereiften Retina, denn Rb hemmt normalerweise die Proliferation. Die Klonierung des Retinoblastom-Gens ermöglichte die genaue Untersuchung, wie das Genprodukt diesen Effekt bewirkt. Das Rb-Protein ist ein sehr häufiges Molekül im Zellkern von Säugerzellen. Es bindet an viele andere Proteine, einschließlich einiger wichtiger Gen-regulatorischer Proteine (z.B. unphosphoryliertes E2F); seine Bindungskapazität hängt jedoch von seinem Phosphorylierungsgrad ab. Ist **Rb unphosphoryliert**, bindet es an eine Reihe regulatorischer Proteine, die für die Zellproliferation verantwortlich sind und hält sie damit inaktiv. Die **Phosphorylierung von Rb** veranlaßt die Freisetzung dieser Proteine und erlaubt die Ausübung ihrer normalen Funktion(en).



111: Das Rb Protein bindet den Transkriptionafaktor E2F und verhindert damit dessen Phosphorylierung = Aktivierung

In normalen Zellen ist das Rb-Protein ständig vorhanden, unabhängig ob sich die Zellen in der G0- oder in der Teilungsphase befinden. Allerdings ändert sich der Phosphorylierungsgrad: in Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, ist Rb hypophosphoryliert und hemmt die Transkription der Gene Fos und Myc. In mutierten Zellen, denen eine oder zwei funktionsfähige Kopien des Rb-Gens fehlen, werden Fos und Myc auf einem hohen Niveau transkribiert.

Interessanterweise können viele virale Regulator-Proteine (*immediate early protein*) ebenfalls an Rb binden und lösen so den Komplex aus Rb und E2F auf. Dies zwingt die Zellen in den Zellzyklus, den viele dieser Viren benötigen, damit sie in die Wirts-DNA integrieren können, bzw. ihren viralen Lebenzyklus ablaufen lassen können.

Wachstumsfaktoren erleichtern die Hemmung, die von dem Rb ausgeübt wird, indem sie eine Phosphorylierung des Rb-Proteins an mehreren Serin- und Threonin-Resten verursachen. Die Zellen beginnen nun mit der Expression des Cdk-Proteins, durchlaufen den Gl-Restriktionspunkt und gehen zur DNA-Synthese über. In proliferierenden Zellen steigt und fällt in jedem Zyklus die Phosphorylierung des Rb-Proteins: am Ende der Gl-Phase steigt sie an, bleibt während der S- und G2-Phase hoch und fällt dann wieder in den dephosphorylierten Zustand zurück, wenn die Zelle die Mitose durchläuft. *In vitro* stellt das Rb-Protein ein gutes Substrat für die Phosphorylierung durch Proteinkinasen aus der Familie der Cdk-Proteine dar und zeigt eine Möglichkeit, wie der Phosphorylierungsgrad des Rb eng an den Zustand des Kontrollsystems des Zellzyklus gekoppelt sein kann.

In den meisten Zellen jedoch wird die Situation durch die Anwesenheit von mehr als einem Rb-ähnlichen Protein komplizierter, und viele Zellarten scheinen ein normales Verhalten zu zeigen, auch wenn das Rb fehlt (Transgene Mäuse, die das Rb-Gen nicht besitzen, durchlaufen die erste Hälfte der Embryonalentwicklung nahezu normal, sterben aber dann und weisen nur in einigen bestimmten Geweben Defekte auf). Das Verständnis für anti-Proliferations-Gene wie Rb ist eine wichtige Aufgabe, da Unzulänglichkeiten in diesen Genen eine wesentliche Rolle bei einer großen Anzahl menschlicher Kebsarten spielen.

In einem höheren Tier wird die Zellproliferation nicht einfach durch die Umgebung der Zelle gesteuert, sondern hängt in komplexen Zusammenhängen von der langfristigen Geschichte der Zelle ab: jeder spezialisierte Zelltyp ist in jedem Entwicklungsstadium des Tiers etwas verschiedenen Regeln unterworfen, die Unterschiede in seinem inneren Kontrollmechanismus wiedergeben. Das vielleicht einfachste, aber zugleich auch das geheimnisvollste Beispiel von langfristigen Effekten der Zellteilung stellt das Phänomen der **Zellalterung** dar.

Die meisten normalen Zellen im Körper eines Säugetiers oder Vogels zeigen eine erstaunliche Abneigung dagegen, ihre Vermehrung unbegrenzt fortzusetzen, sogar wenn sie sorfältig *in vitro* (Zellkultur) ernährt werden. So durchlaufen Fibroblasten, die man aus einem menschlichen Embryo entnimmt, nur etwa 50-mal die Zellteilung, wenn man sie in einem Standard-Nährmedium wachsen läßt (**Hayflick-Limit**). Gegen Ende dieses Zeitraums verlangsamt sich die Vermehrung, kommt schließlich zum Stillstand, und die Zellen treten in die G0-Phase ein, die sie nicht mehr verlassen (**Seneszenz**). Entnimmt man einem 40-jährigen die gleichen Zellen, dann endet die Zellteilung nach 40 Verdoppelungen, und Zellen eines 80jährigen teilen sich nur noch 30-mal. Fibroblasten aus Tieren mit kürzerer Lebenserwartung stellen in der Zellkultur die Teilung bereits nach wenigen Zyklen ein. Auf Grund des Zusammenhangs mit der Alterung des gesamten Körpers wurde dieses Phänomen als Zellalterung bezeichnet.

Die Seneszenz ist ein rätselhafter Vorgang, von dem weder Funktion noch Mechanismus völlig bekannt sind. Zur Erklärung des Phänomens wurden einige Theorien aufgestellt (Ansammlung schädlicher Mutationen; Schutz vor Krebs durch Begrenzung der Zellteilungsanzahl). Es gibt jedoch gute Argumente, die gegen beide Interpretationen sprechen. Eine einzige Studie der letzten Jahre konnte überzeugend zeigen, daß Zellen in Seneszenz mit einem “aktivierten Onkogen” diese “ruhende Phase” nicht verlassen können, wohl aber wenn zwei sog. “kooperierende Onkogene” vorhanden sind. Dies läßt den Schluss zu, daß Seneszenz doch so etwas wie ein **Schutzmechanismus** der Natur sein könnte, der vorsorglich greift, bevor sich nach den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit zuviele Mutationen in einer Zelle anhäufen.

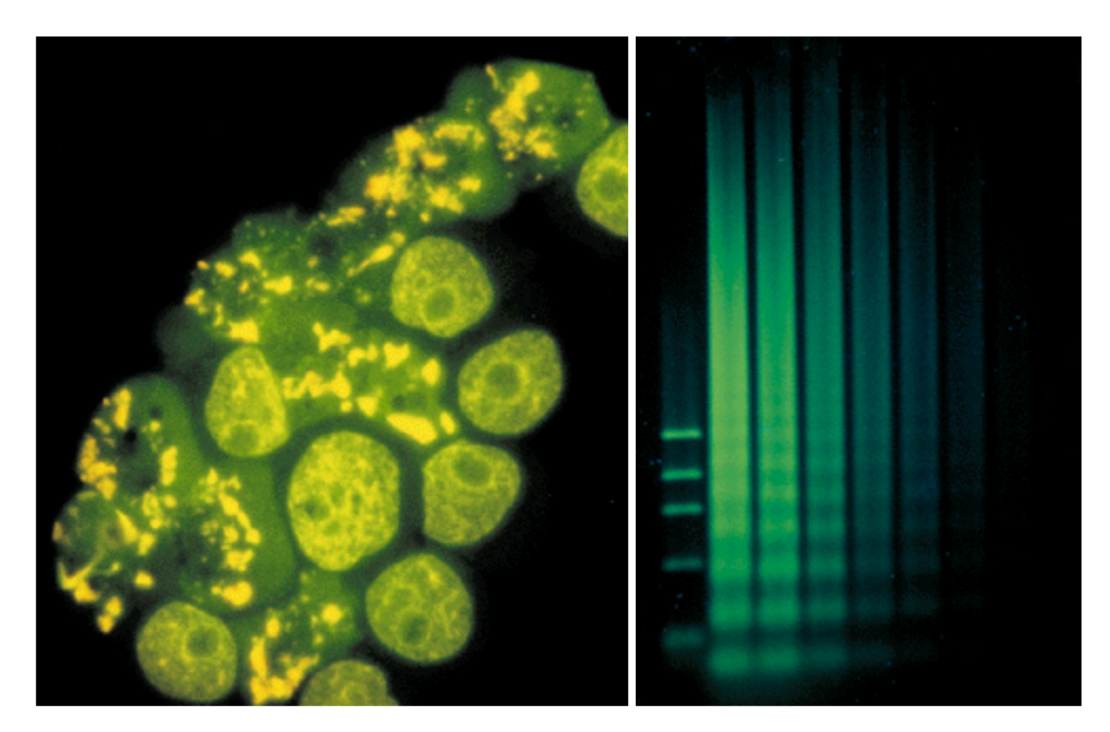
• *Apoptose*

1972 untersuchten Kerr, Wyllie and Currie sterbende Zellen und unterschieden dabei zum ersten Mal zwischen zwei unterschiedlichen Formen des Zelltodes: **Nekrose** und **Apoptose**. Nekrose ist diejenige Form des Zelltodes, die durch einen metabolischen Kollaps einer Zelle auftritt und niemals während der normalen Entwicklung beobachtet wird. Sie ist stets das Resultat von Verletzungen oder toxischer Einwirkung. Im Gegensatz dazu ist der programmierte Zelltod (Apoptose) ein zentraler Bestandteil der normalen Entwicklung. Er ist genetisch vorgegeben und in Prozesse wie Organogenese, Gewebe Homoöstase und in die "Ausbildung" und "Erziehung" unseres Immunsystems essentiell involviert.

In Zellverbänden findet man stets nur einzelne Zellen, die in Apoptose involviert sind, während nekrotische Prozesse oftmals große Gewebe-Bereiche betreffen können. **Typische Entzündungsreaktionen** findet man nur bei nekrotischen Prozessen, **nicht** aber bei apoptotischen Prozessen.

Während der Apoptose sieht man, daß die betroffene Zelle ihren **Kontakt** zur Nachbarzellen verliert, sie **schrumpft** in ihrer Größe und das Chromatin des Zellkern **kondensiert**. Schließlich wird die genomische DNA des Zellkerns **internukleosomal hydrolysiert**, wobei das typische Muster einer **DNA-Leiter** von ca. 180 bp und einem Vielfachen davon entsteht.

Die Proteine der Zellmembran werden vernetzt und machen die Membran sehr undurchlässig. Naturgemäß phagozytieren Nachbarzellen oder Gewebe-Makrophagen solche apoptotischen Zellen. Unter bestimmten Umständen kann Apoptose die Reaktion auf bestimmte Umstände sein. Drunter fallen: abnormale exogene Stimulation nach hormoneller Behandlung oder falsche Mengen an Cytokinen, aberrante oder ektope Genexpression (z.B. von Oncogenen oder Tumorsuppressor-Genen), oder als Antwort auf eine Vielzahl von toxischen Agenzien, wie z.B. Chemotherapeutika oder ionisierende Strahlung.



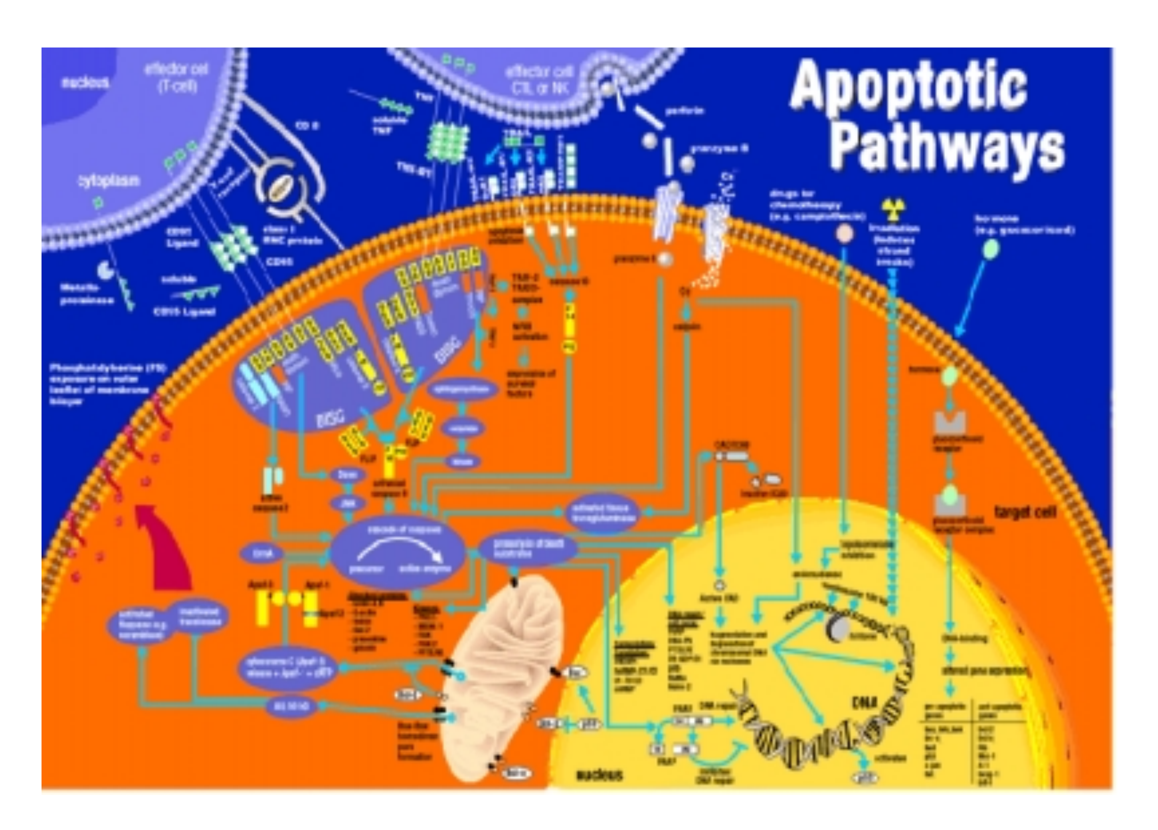
112: DNA Extrakte von Camptothecin-behandelten HL-60 Zellen: die 200 -5000 bp DNA fragments sind charakteristisch für apoptotische Zellen

Aus den genannten Gründen interessieren sich viele Wissenschaftler für die molekularen Mechanismen des apoptotischen Vorgangs, denn sie beinhalten ein großes Potential zur Entwicklung von neuartigen Strategien der Krebstherapie.

Es gab in der Vergangenheit sehr gute experimentelle Hinweise, daß bestimmte Gene der Zellzykluskontrolle auch in Prozesse der Apoptose involviert sind. Ein berühmtes Beispiel dafür ist p53, ein Tumorsuppressor-Protein. Normale Thymozyten gehen z.B. in Apoptose, wenn man sie in der G0-Phase des Zellzykluses mit Glucocorticoide füttert oder sie mit ionisierender Strahlung behandelt. Für diesen Effekt ist das p53 Protein anscheinend sehr wichtig, denn die Thymozyten einer p53 knock-out Maus sind nach einer solche Behandlung extrem Apoptose-resistent.

Das *p53* und das *Rb* Tumorsuppressor-Gen sind zudem in die Karzinogenese von Säugerzellen involviert. Auch viele virale Proteine interagieren mit den beiden Genprodukten, dem **p53** und **Rb Protein**, und blockieren so deren Möglichkeit, Apoptose zu induzieren. Diese anti-

apoptotische Wirkung ist z.B. für spezifische Proteine des SV40 Virus, einiger Herpes- und Adenoviren untersucht worden. Ähnliche Prozesse wurden auch für Polyoma- und Epstein-Barr-Viren beschrieben.



113: Übersicht über die intrazellulären Signalwege der Apoptose

Der **programmierte Zelltod** ist für die Entwicklung von Geweben und Organismen, sowie für die Homöostase von Geweben und Organen von entscheidender Bedeutung. Dabei wird zur Entfernung von infizierten oder beschädigten Zellen der programmierte Zelltod intrinsisch ausgelöst. Durch diesen besonderen Prozess der “internen Demontage” unter Aufrechterhaltung einer intakten Membranstruktur wird gewährleistet, daß kein Zellinhalt nach außen dringt und dadurch keine Entzündungsreaktion auftritt. Zellen, die in Apoptose gehen, zeigen eine besondere Morphologie: membrangebundene, apoptotische Körperchen, Kondensation des Cytoplasmas und des Zellkerns und die bereits erwähnte Zerstörung der genomischen DNA in die nukleosomale Leiter. Die einzelnen membran-umhüllten Körperchen werden durch Phagozytose (durch Makrophagen) entfernt.

Während der **Embryonalentwicklung** spielen apoptotische Prozesse eine wichtige Rolle. Die Bildung der Endgliedmaßen, wie Finger oder Zehen beruhen auf apoptotischen Prozessen. Kommt es dabei zu Fehlern, so bleiben die Gliedmaßen durch Bindegewebe verbunden.

Die einfachsten Informationen über Apoptose haben wir vom Modellsystem des Fadenwurms, ***Caenorhabditis elegans***, erhalten. Ein adulter *C. elegans* Wurm besteht aus exakt 1090 somatischen Zellen, von denen - exakt - 131 durch Apoptose sterben müssen. Eine ganze Reihe von Genen wurde in *C. elegans* endeckt, die für diesen gezielten Zelltod essentiell sind.

Die Ausführung des programmierten Zelltodes in *C. elegans* beruht auf der Wirkung der drei Gene *ced-3*, *ced-4* and *ced-9* (*ced = cell death defective*), wobei *ced-9* einen Inhibitor kodiert, der die Wirkung der beiden Proteine Ced-3 und Ced-4 kontrolliert (*ced-9 = hum. bcl-2*; *ced-9* k.o.: embryonal letal; *ced-3* und/oder *ced-4* k.o.: keine Apoptose).

Ähnliche Studien in der Taufliege ***Drosophila melanogaster*** haben neben den homologen Genen zu *ced-3*, *ced-4* und *ced-9* noch ein weiteres Gen identifizieren können, das man mit *reaper* bezeichnet hat. Dieses Genprodukt spielt eine entscheidende Rolle für den Initiationsprozess des programmierten Zelltods. Transkripte dieses Gens findet man 1-2 Stunden vor den ersten Anzeichen von Apoptose. Man vermutet, das Reaper Protein Signale aus verschiedenen Kaskaden integriert und so darüber entscheiden, ob und wann das Apoptoseprogramm ausgelöst wird.

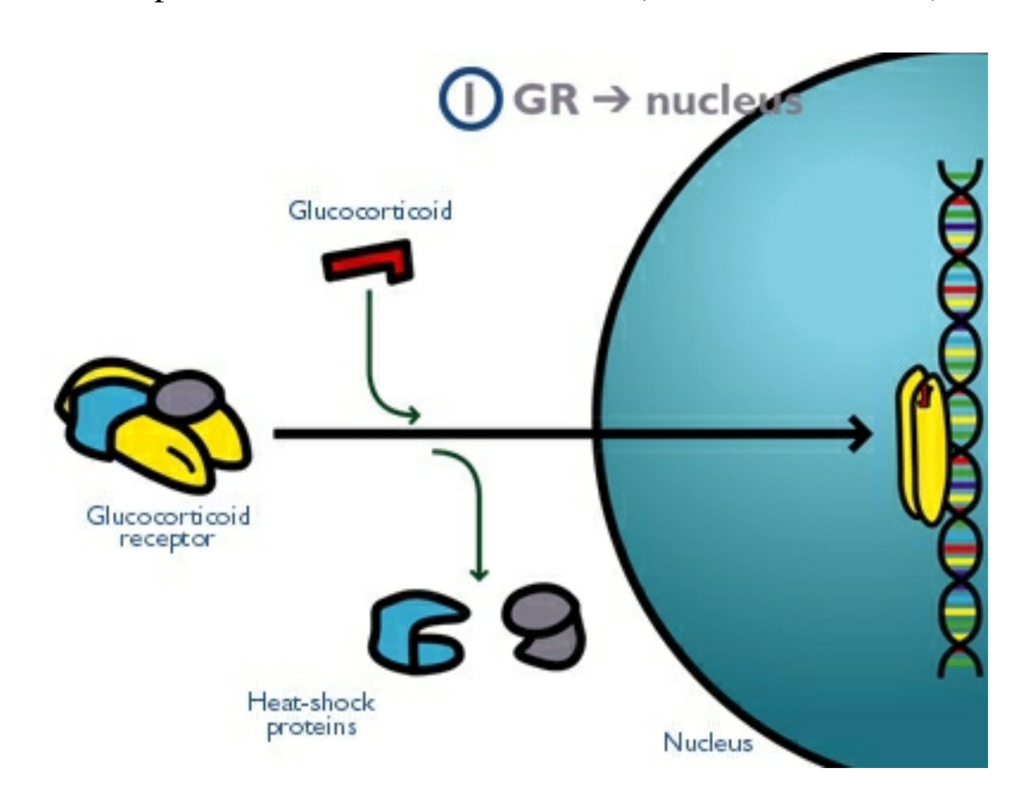
Wie wichtig solche Phänomene sind, kann man an einem einfachen Beispiel verdeutlichen: während unserer eigenen Embryonalentwicklung müssen primordiale Keimzellen an entsprechende Stellen des Embryos wandern, um dort später die Gameten zu bilden. Alle Keimzellen, die dort nicht ankommen, sterben normalerweise durch Apoptose, weil nur am Zielort ein spezifisches Cytokin gebildet wird (steel factor), das die primordialen Keimzellen am Leben halten kann. Ist dieser Prozess gestört, und nicht-angekommene Keimzellen überleben, so entsteht ein bösartiger Tumor, der paradoxerweise den ganzen Organismus tötet.

Beispiel: Glucocorticoid-vermittelte Apoptose in Säugerzellen

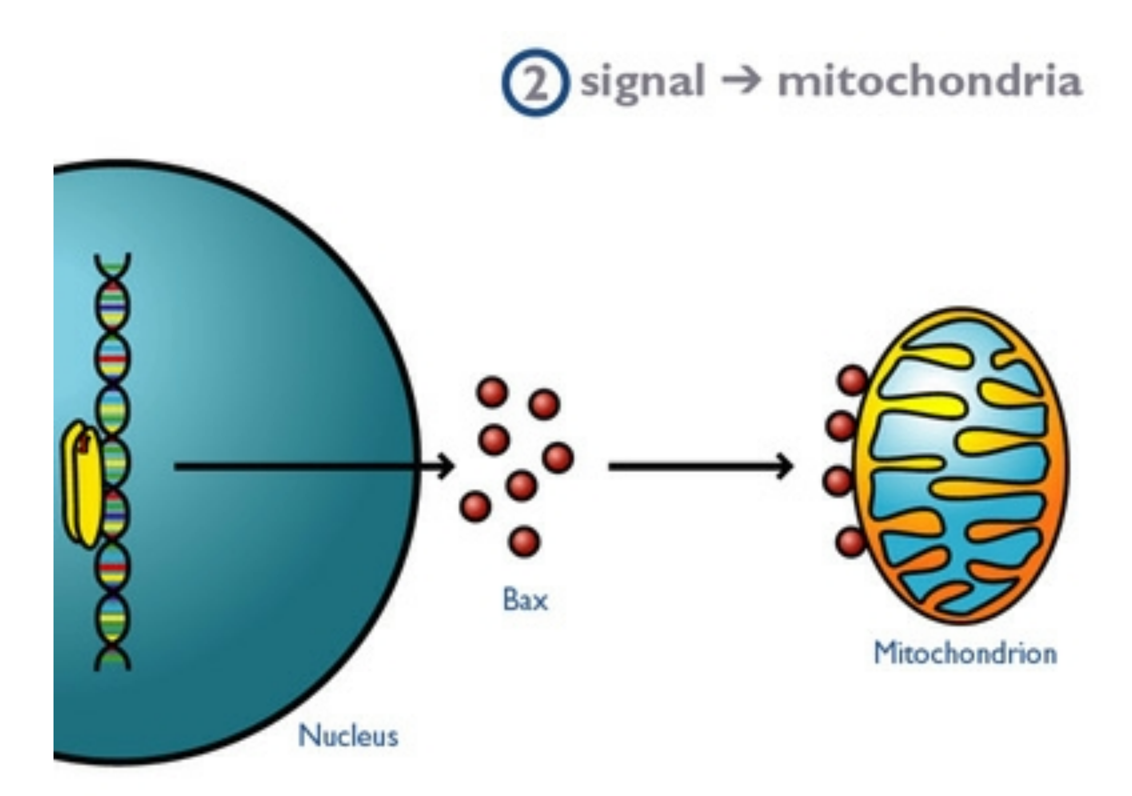
Glucocorticoid ist eines von vielen Molekülen, mit denen man Apoptose induzieren kann. Andere bekannte Induktoren für eukaryonte Zellen sind: TNF, Strahlung und Hunger. Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über den gesamten Prozess:

Der ganze Prozess kann in vier Abschnitte unterteilt werden:

1. Glucocorticoid binded an seinen Rezeptor (GR) und der Komplex wandert in den Zellkern
2. Der Komplex interagiert mit entsprechenden Zielgenen und führt letztendlich zur Expression von Bax. Bax wandert zum Mitochondrium.
3. Bax verursacht Schäden in der äußeren mitochondriellen Membran und Cytochrom c wird aus dem Intermembranraum freigesetzt. Die Atmung des Mitochindriums kommt zum Erliegen. Cytochrom c, aktiviert spezifisch eine Klasse von Proteasen, die Caspasen.
4. Die Caspasen aktivieren Endonukleasen (zerstören die DNA.).

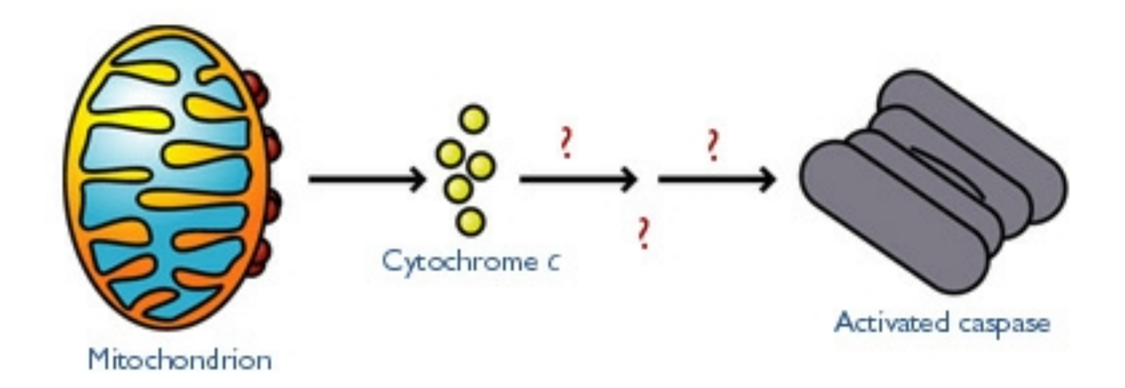


114: Bindung des Hormons an seinen cytosolischen Rezeptor

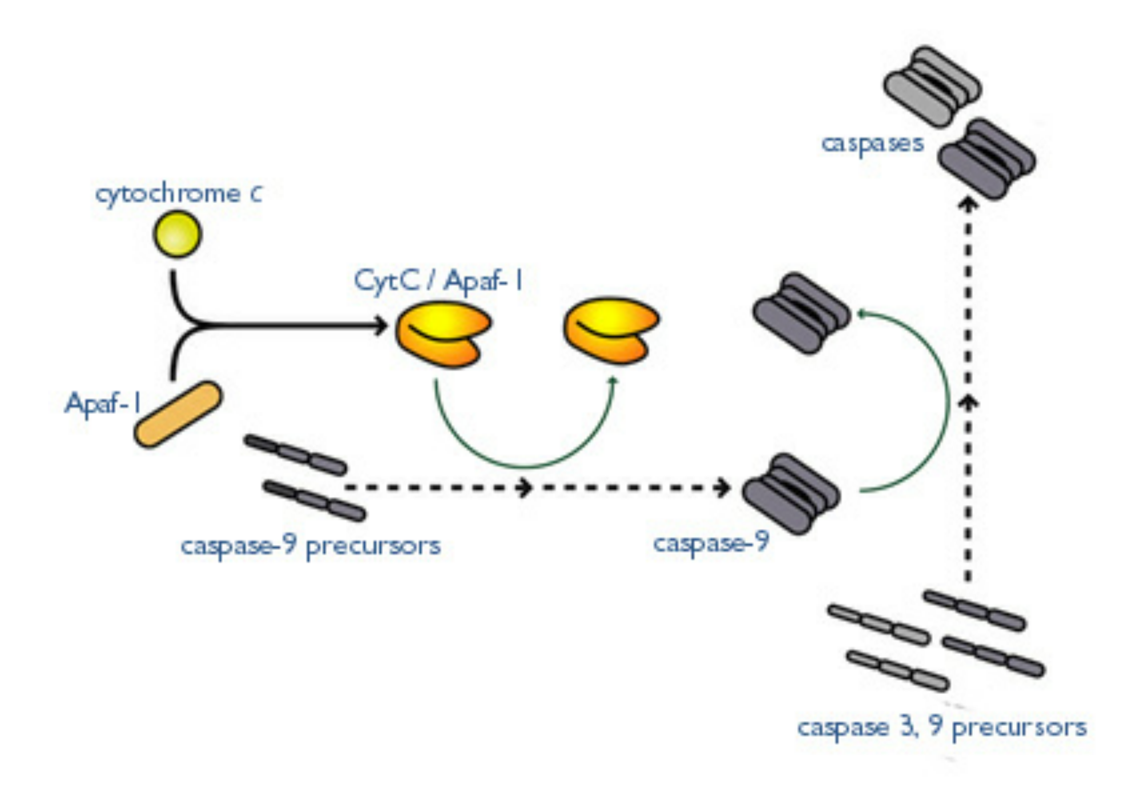


115: Aktivierung von Zielgenen: Produktion von Bax

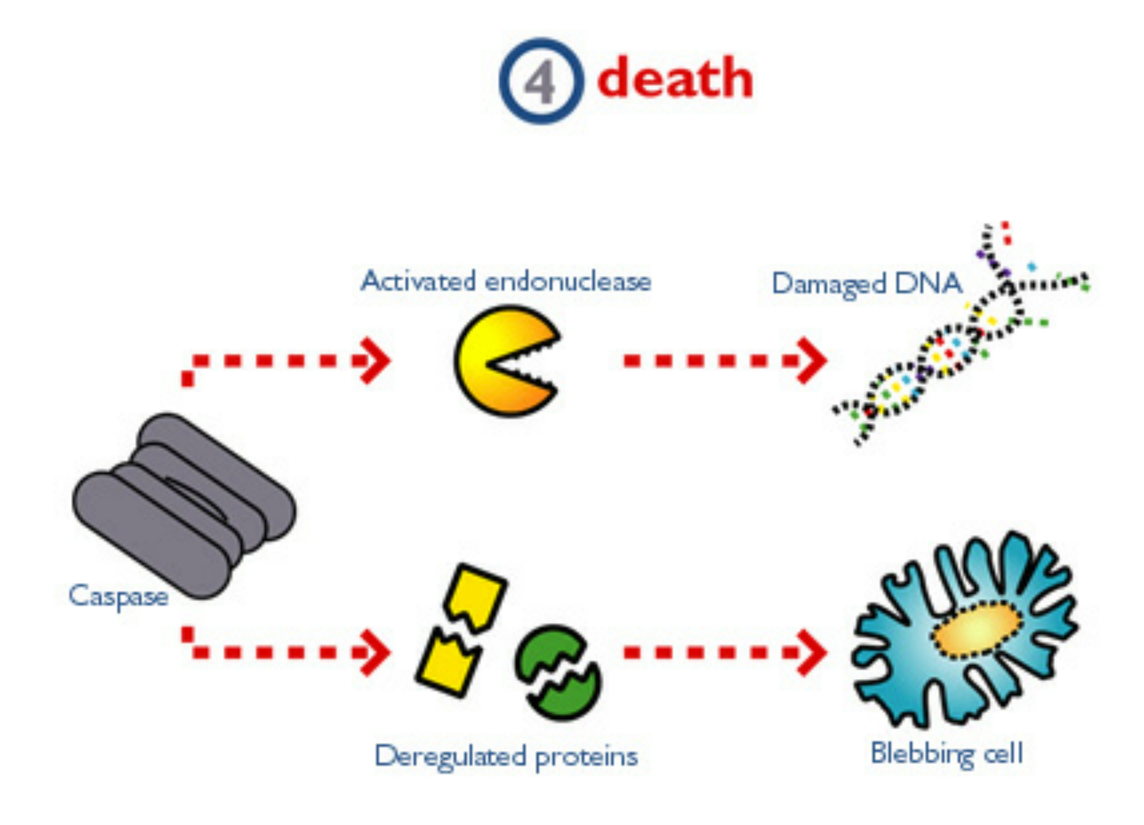




116: Bax bindet an der äußeren Mitochondrienmembran und setzt Cytochrom c frei



117: Cytochrom c aktiviert Caspase 9 und dadurch weitere Caspasen

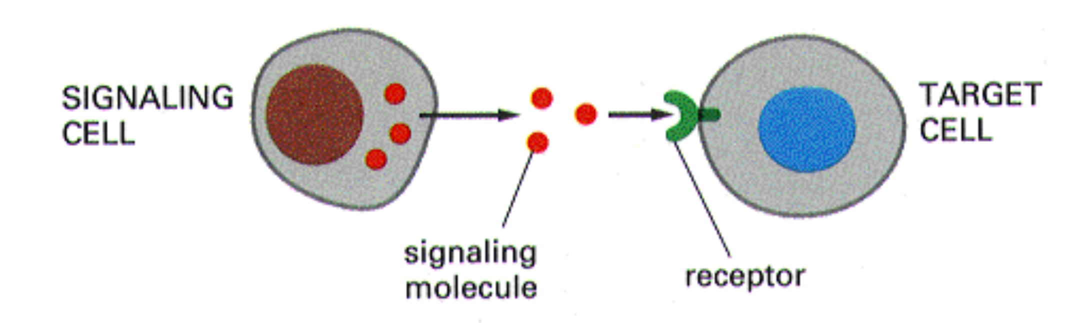


118: Caspasen sind Exekutoren der Apoptose

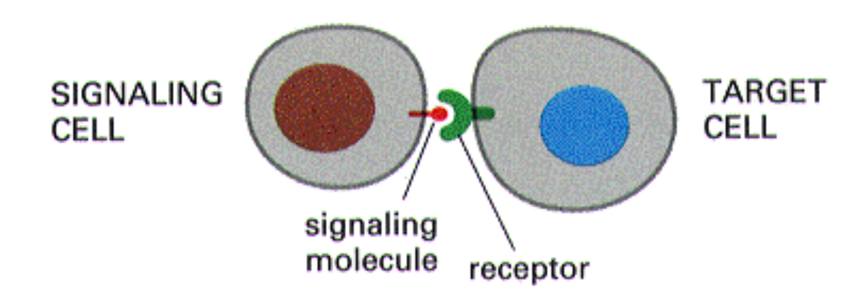
• *Kommunikation*

Die Kommunikation bei höheren Zellen verläuft über Hunderte verschiedener Signalmolekül-Arten. Dazu gehören **Proteine**, kleinere **Peptide**, **Aminosäuren**, **Nukleotide**, **Steroide**, **Retinoide**, **Fettsäurederivate** und sogar **lösliche Gase** (Stickstoffmonoxid und Kohlenmonoxid). Die meisten Signalmoleküle verlassen eine signalisierende Zelle über Exozytose, andere über Diffusion durch die Plasmamembran. Noch andere bleiben an der Zelloberfläche gebunden und können daher nur dann auf andere Zellen wirken, wenn es zu einem direkten Kontakt zwischen den Zellen kommt.

SIGNALING BY SECRETED MOLECULES



SIGNALING BY PLASMA-MEMBRANE-BOUND MOLECULES

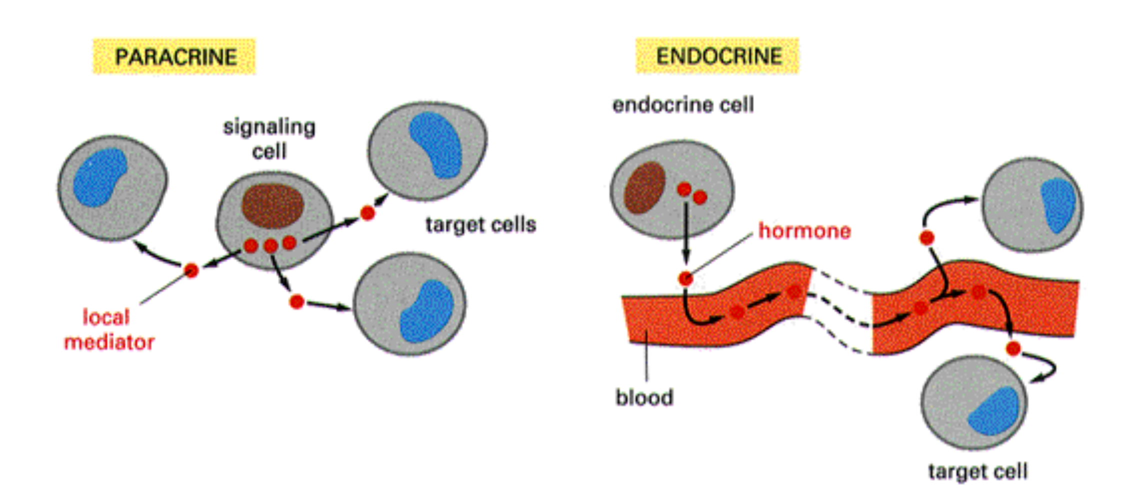


119: Interzelluläre Signalübertragung bei Säugerzellen

Unabhängig von der Natur des jeweiligen Signals antwortet eine Zielzelle mit Hilfe eines spezifischen Proteins, dem sogenannten **Rezeptor**. Dieser bindet spezifisch das Signalmolekül, wodurch eine Signalantwort in der Zielzelle ausgelöst wird. Extrazelluläre Signalmoleküle wirken in sehr geringen Konzentrationen ($< 10^{-8}$ M) und werden mit hoher Affinität (Affinitätskonstante $K_a > 10^8$ L/mol) vom entsprechenden Rezeptor gebunden. Bei den Rezeptoren handelt es sich i.d.R. um **Transmembranproteine**, die sich an der Oberfläche der Zielzelle befinden (z.B. Cytokine, Hormone). Manchmal befinden sich die Rezeptoren jedoch nicht auf der Oberfläche, sondern innerhalb der Zelle, so daß die entsprechenden Liganden zur Aktivierung in die Zelle gelangen müssen: solche Signalmoleküle müssen daher hydrophob genug sein, um durch die Plasmamembran diffundieren zu können (z.B. Steroide, Retinsäuren). Die Bindung des extrazellulären Signalmoleküls (Ligand) bewirkt in beiden Fällen die Aktivierung einer Kaskade intrazellulärer Signale; diese lösen i.d.R. eine **Genaktivierung** aus, was zu einer **Verhaltensänderung** der Zelle führt.

Signalmoleküle, die aus einer Zelle ausgeschleust werden, können an einen weit entfernten Wirkort gebracht werden, oder als sogenannte lokale Mediatoren nur auf Zellen wirken, die sich in unmittelbarer Nähe der signalisierenden Zelle befinden. Dieser Prozeß wird als **parakrine Signalübertragung** bezeichnet. Um zu gewährleisten, daß parakrine Signale nur in der näheren Umgebung wirken, dürfen sie nicht zu weit diffundieren; oft werden sie daher sehr schnell von der benachbarten Zielzelle aufgenommen, von extrazellulären Enzymen abgebaut oder durch Proteine der extrazellulären Matrix immobilisiert.

Endokrine Zellen stellen den zweiten Typ von spezialisierten Signalzellen dar. Sie entlassen ihre Signalmoleküle, die **Hormone**, in den tierischen Blutkreislauf oder in den Pflanzensaft, wodurch die Signalmoleküle über den ganzen Organismus verteilt werden (**systemisches Signal**). So tragen endokrine Zellen auf jeweils charakteristische Weise zur Koordination der Zellen im Körper bei, mit der Einschränkung, daß endokrine Signalvermittlung langsam ist, da sie von Diffusion und vom Blutkreislauf abhängt.



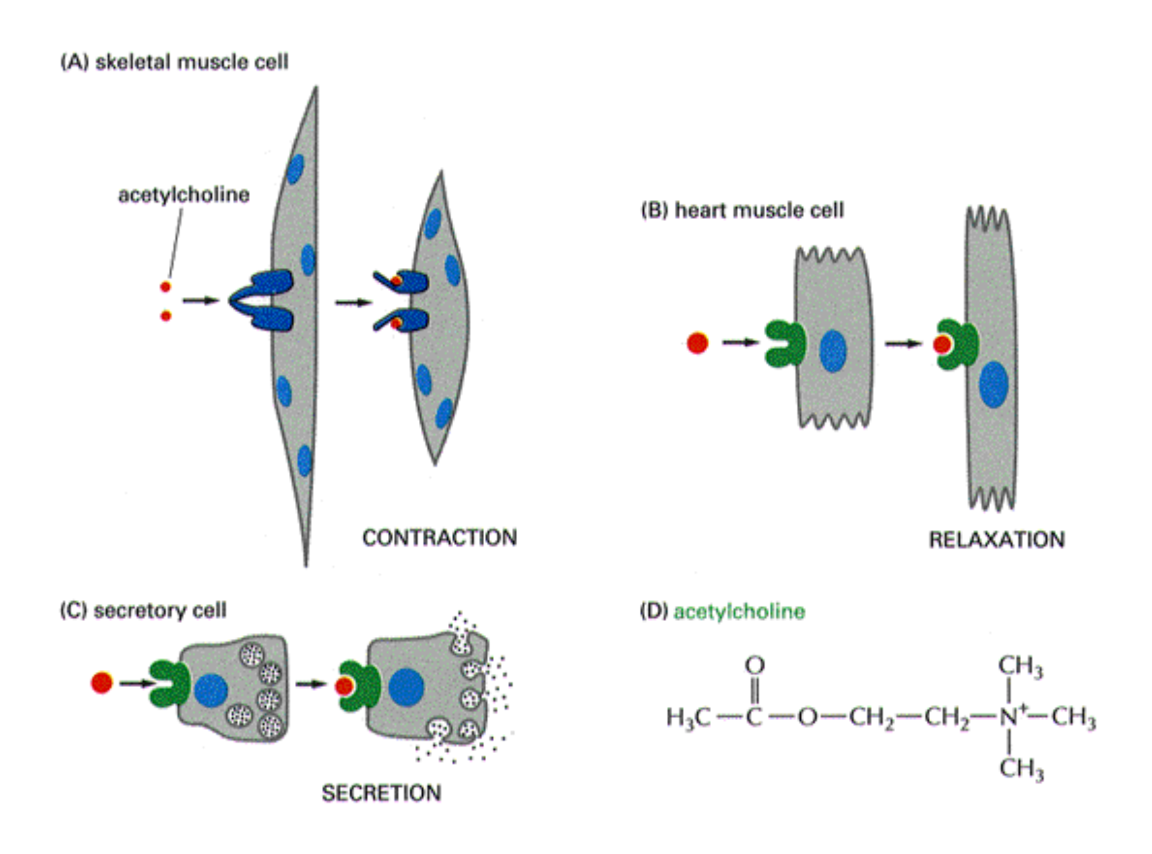
120: Parakrine und endokrine Signalübertragung

Die bisher genannten Arten der Signalvermittlung ermöglichen es einem Zelltyp, einen anderen zu beeinflussen. In gleicher Weise können Zellen aber auch Signale an Zellen desselben Typs aussenden, was bedeutet, daß die gleiche Zelle Signal-Donator und -Akzeptor sein kann und Zellen sich daher selbst aktivieren können. Sezerniert eine Zelle Signalmoleküle, die an die Rezeptoren derselben Zelle binden, spricht man von **autokriner Signalübertragung**. Wenn eine Zelle etwa während der Entwicklung einen bestimmten Differenzierungsweg eingeschlagen hat, könnte sie diese Entscheidung über autokrine Signalübertragung bestätigen. Die autokrine Sigualübertragung ist dann am erfolgreichsten, wenn sich gleichzeitig Nachbarzellen des gleichen Typs an diesem Prozeß beteiligen. Hierdurch können ganze Gruppen identischer Zellen in dieselbe Entwicklungsrichtung gelenkt werden. Autokrine Signalübertragung ist daher für den sogenannten „Gemeinschaftseffekt" während der frühen Entwicklung verantwortlich, bei dem Zellen nicht einzeln, sondern ausschließlich im Verband mit identischen Zellen auf ein Differenzierung-induzierendes Signal antworten.

Koordiniertes Verhalten benachbarter Zellen kann auch über „**Gap-Junctions**" (**Connexone**) vermittelt werden. Solche spezialisierten Zell/Zell-Verbindungen bilden sich zwischen eng aneinanderliegenden Plasmamembranen aus und verbinden das Cytoplasma der Zellen über enge, wassergefüllte Kanäle, die den Austausch kleiner intrazellulärer Signalmoleküle (intrazelluläre Mediatoren) wie Ca^{2+} und cyclisches

AMP (cAMP), nicht aber den von Makromolekülen wie Proteinen oder Nukleinsäuren, erlauben. Zellen, die über Gap-Junctions verbunden sind, können also direkt miteinander kommunizieren, ohne durch die dazwischenliegenden Plasmamembranen behindert zu werden.

Eine Zelle kann auf Umweltreize prinzipiell mit verschiedenen, spezifischen Reaktionen antworten. Das bedeutet, daß das gleiche Signalmolekül in unterschiedlichen Zelltypen unterschiedliche Reaktionen auslöst. Der **Neurotransmitter Acetylcholin**, z.B. stimuliert einerseits die Kontraktion von Skelettmuskelzellen und verringert andererseits das Ausmaß und die Häufigkeit der Kontraktion von Herzmuskelzellen, da die jeweils beteiligten Acetylcholinrezeptoren sich voneineinander unterscheiden. Die unterschiedliche Wirkung eines Signals kann deshalb durch die **verschiedenartige Rezeptorausstattung** der Zelloberfläche und auf **Unterschiede der intrazellulären Signalübertragung** zurückgeführt werden.



121: Acetylcholin hat unterschiedliche Auswirkungen auf verschiedene Zielzellen

Fast alle extrazellulären Signale werden über hydrophile Moleküle vermittelt, die an einen Oberflächenrezeptor der Zielzelle binden. Einige Signalmoleküle sind jedoch **hydrophob** und/oder **klein** genug, um die Plasmamembran auf direktem Weg zu passieren. **Steroidhormone**, **Thyreoidhormone**, **Retinoide** und **Vitamin D** sind kleine, hydrophobe Moleküle, die sich in Struktur und Funktion voneinander unterscheiden, aber ihre Wirkungsweise ist ähnlich: sie diffundieren durch die Plasmamembran und binden an intrazelluläre Rezeptorproteine.

122: Signalmolekül-Beispiele, die ausschließlich an intrazelluläre Rezeptoren binden

Durch die Bindung des Liganden wird der entsprechende Rezeptor aktiviert und - nach einem Kernimport - kann dieser Rezeptor-Hormonkomplex die Transkription spezifischer Gene regulieren. Diese Rezeptoren sind bezüglich ihrer Struktur miteinander verwandt und bilden die Großfamilie der **intrazellulären Rezeptoren**.

Alle Steroidhormone einschließlich Cortisol, Sexualhormone, Vitamin D (in Wirbeltieren) und das Häutungshormon Ecdyson (in Insekten) werden aus **Cholesterol** gebildet. Cortisol wird in der Nebennierenrinde

gebildet und greift in den Stoffwechsel vieler Zelltypen ein:

- die **steroiden Sexualhormone** werden in den **Hoden** oder **Eierstöcken** gebildet und sind für die Ausprägung der sekundären Geschlechtsmerkmale verantwortlich.

- **Vitamin D** wird in der **Haut** unter Einwirkung von **Sonnenlicht** synthetisiert und in der Leber oder Niere in die aktive Form umgewandelt. Vitamin D reguliert den Calciumhaushalt, indem es im Darmtrakt die Ca^{2+}-Aufnahme fördert und in der Niere die Ca^{2+}-Ausscheidung verringert.

- **Thyreoidhormone**, die aus der Aminosäure Tyrosin hergestellt werden, **erhöhen** in vielen Zellen den **Stoffwechsel**.

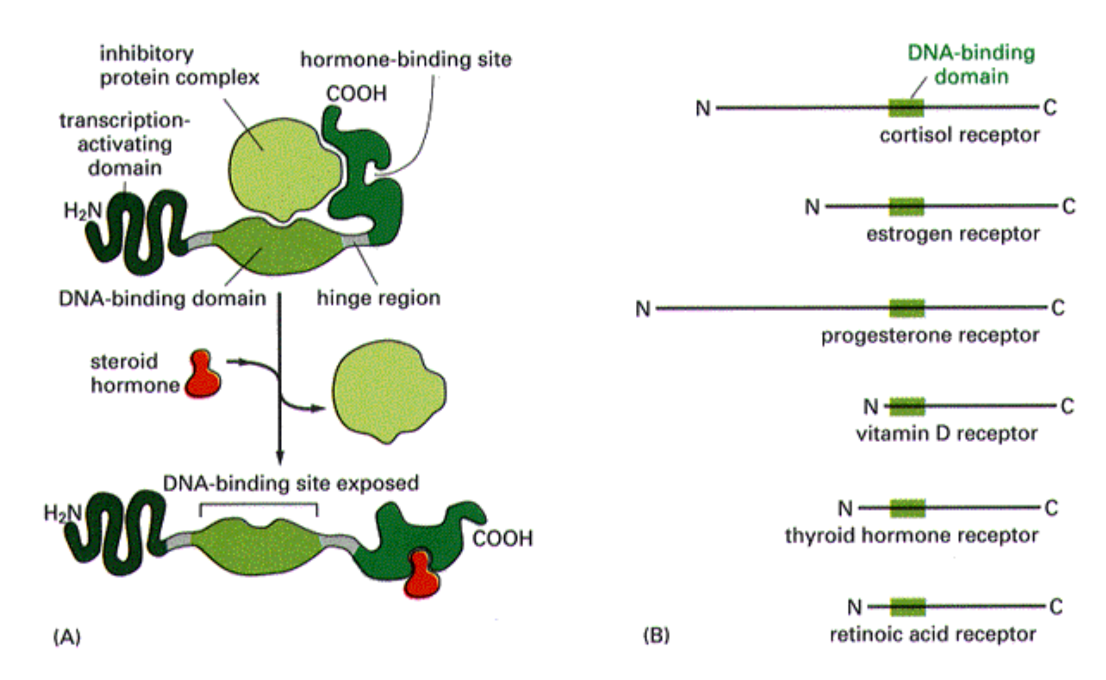
- **Retinoide** - Vitamin A-Derivate wie die Retinsäure - besitzen als lokale Mediatoren bei **entwicklungsspezifischen Prozessen** von Wirbeltieren eine wichtige Funktion haben.

Da die genannten Signalmoleküle relativ wasserunlöslich sind, wird ihre Löslichkeit durch die Bindung an **spezifische Transportproteine** erhöht, so daß sie über das Blut oder andere extrazelluläre Flüssigkeiten transportiert werden können. Vor Erreichen der Zielzelle dissoziieren die hydrophoben Moleküle wieder von den Transportproteinen ab.

Hydrophobe und hydrophile Signalmoleküle unterscheiden sich nicht nur in der Art der Signalübertragung, sondern auch in ihrer Aufenthaltsdauer im Blut oder in den Gewebsflüssigkeiten. Die meisten wasserlöslichen Hormone werden innerhalb von Minuten aus dem Blut oder dem extrazellulären Raum entfernt, bei lokalen Mediatoren oder Neurotransmittern dauert es sogar nur Sekunden oder Millisekunden. Im Gegensatz dazu verbleiben Steroidhormone mehrere Stunden, Thyreoidhormone sogar tagelang im Blut. Dementsprechend lösen hydrophile Signalmoleküle eher kurz andauernde, hydrophobe Signalmoleküle dagegen eher länger anhaltende Reaktionen aus.

Intrazelluläre Rezeptoren für Steroid- bzw. Thyreoidhormone, Retinoide oder Vitamin D binden an spezifische DNA-Sequenzen, die in der Nähe des hormonregulierten Gens liegen. Cortisol-Rezeptoren, die sich

normalerweise im Cytosol befinden, binden nur nach Assoziation mit dem entsprechenden Liganden an die DNA; andere, wie die Retinsäure-Rezeptoren, befinden sich vorwiegend im Kern und binden sogar in Abwesenheit des Liganden an die DNA. In jedem Fall führt die Bindung des Liganden zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins, das dann die Gen-Transkription aktiviert (oder manchmal supprimiert). Häufig vollzieht sich die Antwort in zwei Stufen: in weniger als 30 Minuten findet als Primärantwort eine direkte Induktion der Transkription einiger weniger, spezifischer Gene statt; diese Genprodukte leiten die verzögerte Sekundärantwort ein, indem sie wiederum andere Gene aktivieren. Auf diese Weise kann ein einfacher hormoneller Auslöser weitreichende Veränderungen im Genexpressionsmuster nach sich ziehen.



123: Grundprinzip der intrazellulären Rezeptoren: ein Inhibitor hält den Rezeptor in einer inaktiven Konfiguration; nach Bindung des Liganden wird diese Konformation verändert.

Wie prinzipiell alle Reaktionen auf extrazelluläre Signale, wird auch die Art der Antwort auf Steroid- und Thyreoidhormone, Vitamin D oder Retinoide gleichermaßen durch die Natur der Zielzelle als auch durch die Art des Signalmoleküls bestimmt. Selbst wenn in verschiedenen Zelltypen identische intrazelluläre Rezeptoren an der Reaktion beteiligt

sind, werden stets unterschiedliche Gene reguliert. Der Grund dafür ist, daß immer mehrere Regulatorproteine an den jeweiligen DNA-Abschnitt des zu aktivierenden Gens binden müssen. **Ein intrazellulärer Rezeptor kann also immer nur dann die Transkription eines Gens aktivieren, wenn alle anderen Regulatorproteine, von denen einige Zelltyp-spezifisch sind, auch in der Zelle vorliegen.**

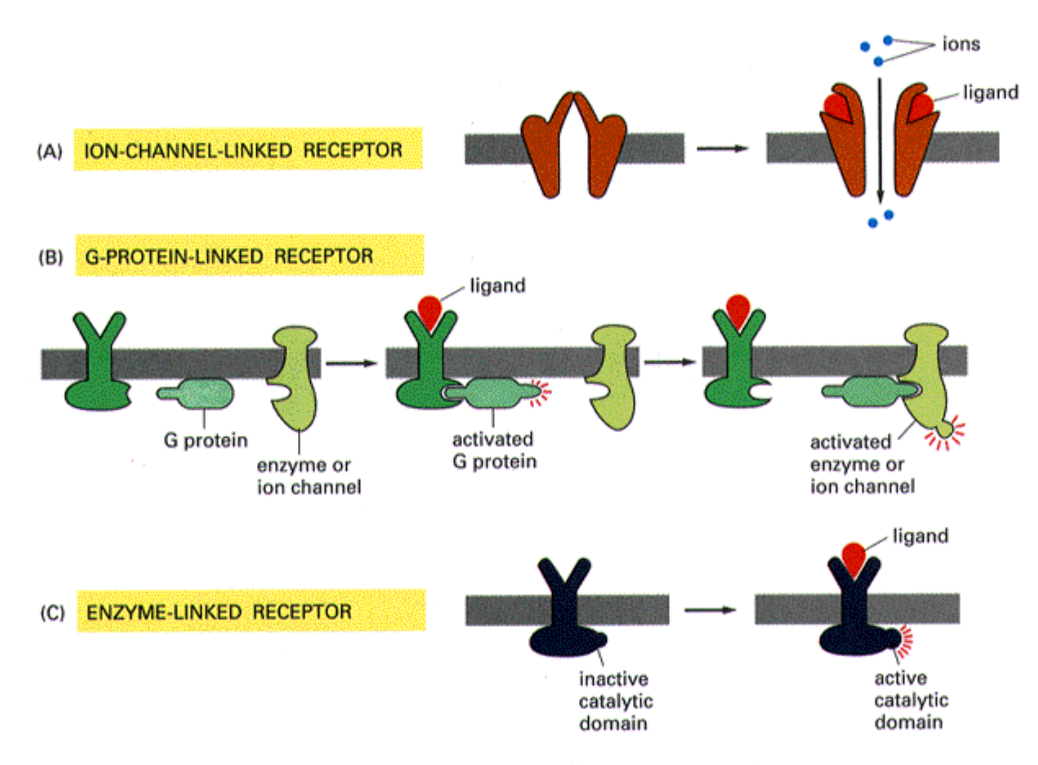
Im Gegensatz zu den Mechanismen der intrazellulären Rezeptoren müssen die meisten Liganden an der Zelloberfläche ihrer Zielzellen binden, um eine physiologische Reaktion zu induzieren. Prinzipiell unterscheidet man drei Tyen von Zelloberflächen-Rezeptorproteinen: **Ionenkanal-gekoppelte**, **G-Protein-gekoppelte** und **katalytische Rezeptoren**.

Nur mit Hilfe von modernen Techniken, wie der Molekularbiologie, ist es gelungen, die Rezeptoren und intrazellulären Proteine, die an der Signalübertragung in der Zelle beteiligt sind, zu isolieren und anschließend zu charakterisieren. Durch die Aufklärung der Gensequenzen vieler Rezeptoren hat sich gezeigt, daß sich die verwirrende Vielfalt der Rezeptorproteine auf eine wesentlich kleinere Zahl großer **Familien** reduzieren läßt. Zudem haben es moderne Techniken ermöglicht, die 3-dimensionale Proteinstruktur zu analysieren. Da solche Proteine oft nur 0,0 1% der Gesamtproteinmenge einer Zelle ausmachen, wäre ihre konventionelle Reinigung äußerst schwierig gewesen.

Entsprechend ihrem Signalübertragungs-Mechanismus lassen sich die meisten Zelloberflächen-Rezeptoren in drei Klassen einteilen. **Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren** (Transmitter-abhängige Ionenkanäle) genannt, sind am schnellen synaptischen Signalprozess zwischen elektrisch erregbaren Zellen beteiligt. Diese Art von Signalübertragung wird von wenigen Neurotransmittern vermittelt, die an Proteine des Ionenkanals binden, der sich daraufhin vorübergehend öffnet oder schließt, wodurch sich die Permeabilität der Plasmamembran für bestimmte Ionen und somit auch die Erregbarkeit der postsynaptischen Zelle ändert. Die Ionenkanal-Rezeptoren gehören zu einer Familie homologer Transmembranproteine, die die Plasmamembran mehrmals durchspannen.

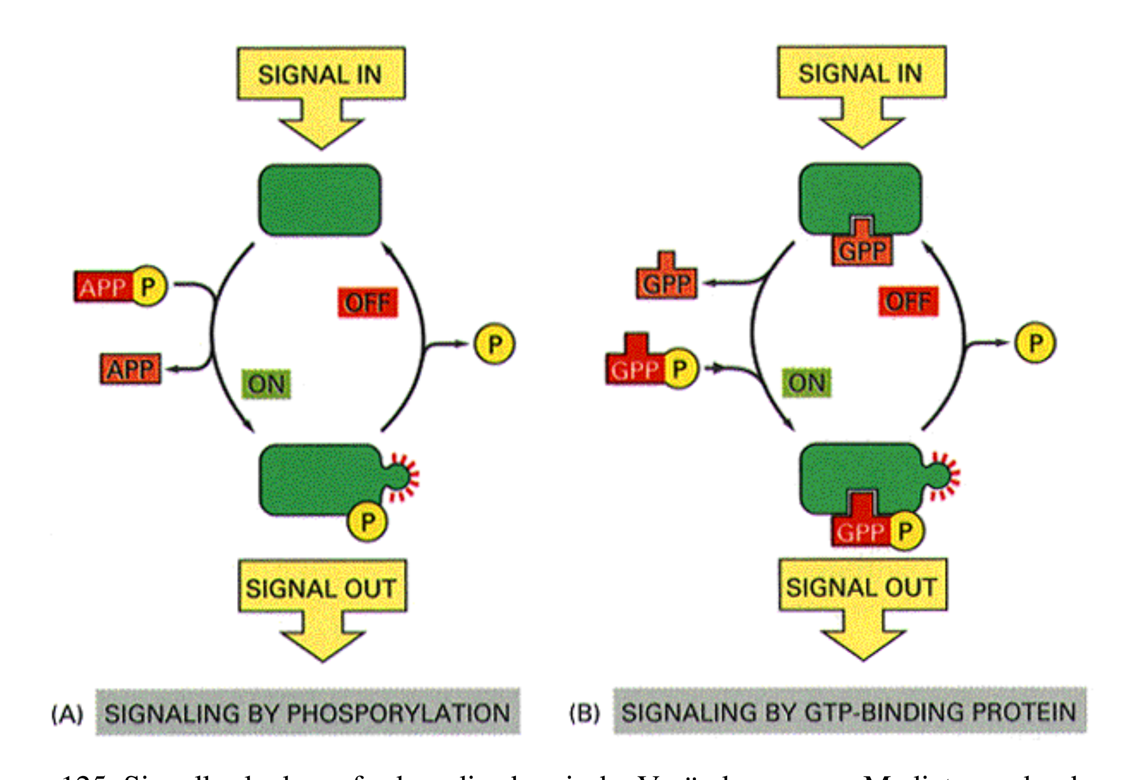
G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wirken indirekt, indem sie die Aktivität eines weiteren membrangebundenen Zielproteins, das ein Enzym oder Ionenkanal sein kann, regulieren. Die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Zielprotein wird durch ein drittes Protein, ein trimeres GTP-bindendes Regulatorprotein (G-Protein), vermittelt. Das aktivierte Zielprotein kann entweder die Konzentration intrazellulärer Mediatoren (wenn es ein Enzym ist) oder die Ionenpermeabilität der Plasmamembran (wenn es ein Ionenkanalprotein ist) verändern. Intrazelluläre Mediatoren wirken ihrerseits verändernd auf das Verhalten weiterer zellulärer Proteine. Alle G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gehören zu einer großen Familie homologer Proteine, die die Plasmamembran siebenfach durchspannen.

Katalytische Rezeptoren wirken entweder selbst als Enzyme oder sind mit Enzymen assoziiert. Meistens durchspannen sie die Membran nur einmal, wobei die Bindungsstelle für den Liganden sich außerhalb, der katalytische Teil sich innerhalb der Zelle befindet. Verglichen mit den beiden anderen Gruppen sind katalytische Rezeptoren heterogen, obwohl die meisten unter ihnen selbst **Proteinkinasen** oder mit Proteinkinasen assoziiert sind, die in der Zielzelle spezifische Gruppen von Proteinen phosphorylieren.



124: Die drei prinzipiellen Rezeptorklassen

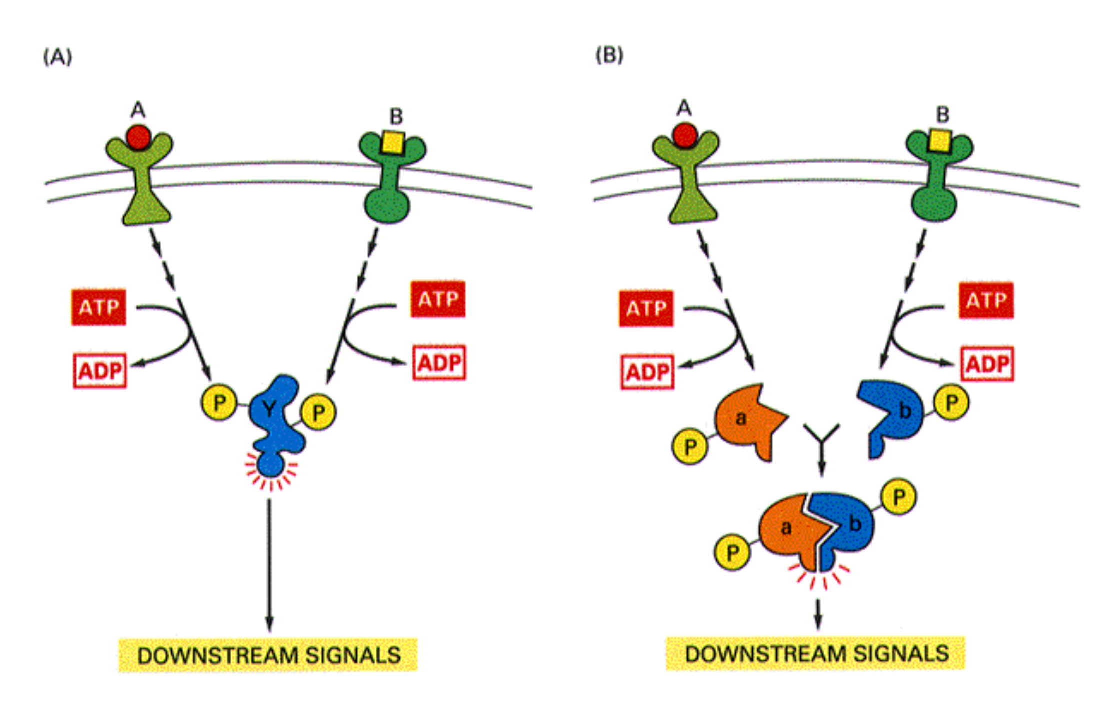
Die Verbindung zwischen Rezeptor und Kern wird über ausgetüftelte Kombinationen spezialisierter **intrazellulärer Signalmoleküle** hergestellt. Das sind entweder Proteine, die als Antwort auf das ankommende Signal von Proteinkinasen **phosphoryliert** werden, oder Proteine, die **GTP binden**. In beiden Fällen gewinnen Proteine in der aktivierten Form eine oder mehrere Phosphatgruppe(n), die sie wieder verlieren, wenn das Signal abklingt. Diese Proteine führen wiederum zur Phosphorylierung weiterer Proteine, die sich in der Rangfolge der Phosphorylierungskaskade auf einer niedrigeren Ebene befinden.



125: Signalkaskaden erfordern die chemische Veränderung von Mediatoren durch Phosphorylierung oder Bindung von energiereichen Triphosphaten

Zwei Arten von Proteinkinasen sind an der Bildung von Phosphorylierungskaskaden beteiligt: **Serin/Threonin-Kinasen** (die Phosphatgruppen auf die Aminosäuren Serin oder - weniger häufig - Threonin übertragen) und **Tyrosinkinasen**, die Proteine an Tyrosinresten phosphorylieren. Man schätzt, daß ungefähr 1% unserer Gene für Proteinkinasen kodiert. Obwohl weniger als 0,1 % aller phosphorylierten Proteine der Zelle Phosphatyrosin enthalten, spielt diese Minderheit eine bedeutende Rolle bei der Signalübertragung.

Die Verarbeitung von extrazellulären Signale geschieht in einem integrativen Prozess über das Zusammenspiel der verschiedenen Phosphorylierungskaskaden. Ähnlich wie die Mikroprozessoren eines Computers übernehmen einige Signalproteine in Kaskaden eine integrierende Funktion: als Antwort auf einen vielfältigen Signal-Input produzieren sie einen Output, der auf das Erreichen der gewünschten biologischen Wirkung ausgerichtet ist. In der nächsten Abbildung sind zwei Möglichkeiten veranschaulicht, wie Signalintegrationen über Proteine erreicht werden können.



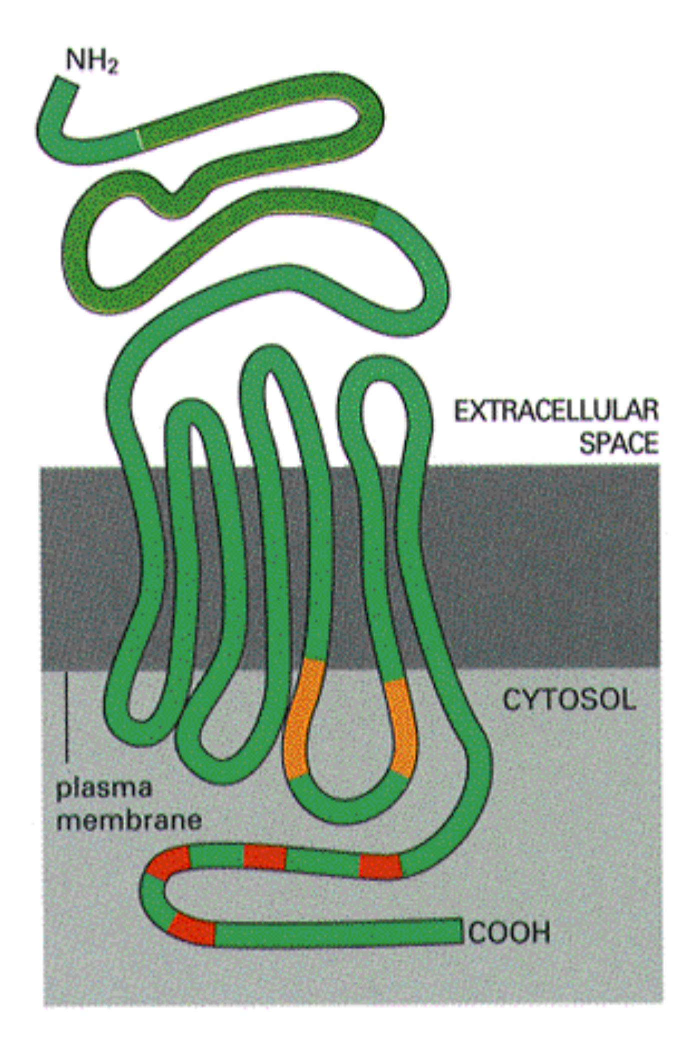
126: Integration von Signalen; A. Signale entstehen, wenn mehr als nur ein Oberflächenrezeptor signaliert; B. Signale entstehen, wenn zwei intrazelluläre Signalkaskaden zusammenlaufen.

- **G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN**

  stellen die größte Familie der Zelloberflächen-Rezeptoren dar. In Säugern konnten bisher über 100 Mitglieder dieser Familie identifiziert werden. Viele dieser Rezeptoren wurden über Homologie-Klonierung oder durch Expressions-Klonierung entdeckt. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermitteln die Antwort auf eine **enorme Anzahl von Signalmolekülen**. Dazu gehören Hormone, Neurotransmitter und lokale Mediatoren, die sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer Funktion sehr verschiedenartig sind: das Spektrum umfasst Proteine und kleine

Peptide, aber auch Fettsäurederivate und Aminosäuren. Der gleiche Ligand kann verschiedene Rezeptoren einer Familie aktivieren. Mindestens **9** verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden z.B. **Adrenalin**, **5** oder mehr binden **Acetylcholin**, und über **15** werden durch **Serotonin** aktiviert.

Ungeachtet der chemischen und funktionellen Unterschiede des gebundenen Signalmoleküls, sind sich alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren hinsichtlich ihrer Struktur sehr ähnlich. Zumindest unter den Rezeptoren, deren Aminosäure-Sequenz bereits bekannt ist, besteht eine evolutionäre Verwandtschaft. Diese Proteine werden aus einer einzigen Polypeptidkette gebildet, die die Lipid-Doppelschicht siebenfach durchspannt (zu dieser Familie von Transmembranrezeptoren zählen auch Rhodopsin, das Licht-aktivierbare Protein aus dem Wirbeltierauge, und olfaktorische Rezeptoren der Wirbeltiernase).

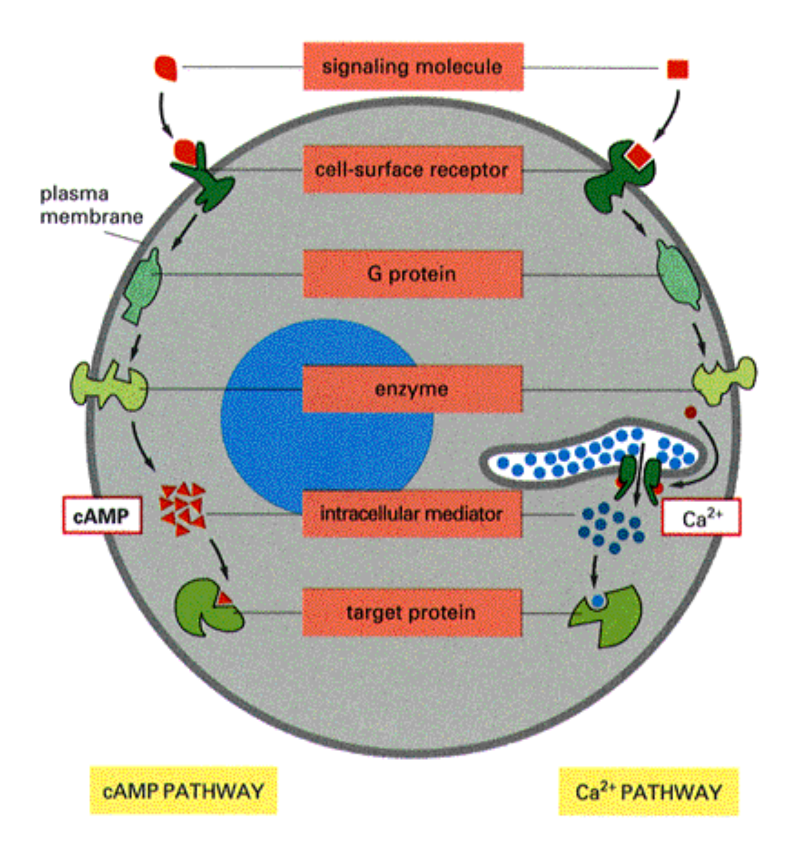


127: Grundstruktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors

Trimere GTP-bindende Proteine (G-Proteine), die zwischen Rezeptoren und den dazugehörigen Enzymen bzw. in der Plasmamembran lokalisierten Ionenkanälen eine funktionelle Verbindung herstellen, unterscheiden sich strukturell von den **monomeren GTP-bindenden Proteinen** (monomere GTPasen), die in eukaryontischen Zellen in den vesikulären Transport, bzw. intrazelluläre Signale weiterleiten oder regulieren (siehe Seite 95ff und Seite 188ff).

Beide Klassen GTP-bindender Proteine sind **GTPasen**, die als **molekulare Schalter** zwei verschiedene Zustände einnehmen können: den **aktiven**, GTP-gebundenen und den **inaktiven**, GDP-gebundenen Zustand. Die Bindung eines extrazellulären Liganden an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, woraufhin das mit dem Rezeptor assoziierte trimere G-Protein sein gebundenes GDP durch GTP ersetzt (“**aktiviert**”). „**Inaktiviert**" wird das G-Protein, indem es sein eigenes GTP wiederum zu GDP hydrolysiert. Vor dieser Inaktivierung hat jedoch das Protein noch die Zeit, sich vom Rezeptor abzulösen und sein Signal an ein nachgeschaltetes Zielprotein zu übermitteln.

Die meisten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren lösen **eine Reihe** von Ereignissen aus, die zur Änderung der Konzentration mindestens eines kleinen intrazellulären Signalmoleküls führen. Diese kleinen Signalmoleküle, oft als **intrazelluläre Mediatoren** (*second messenger*) bezeichnet, setzen die Signalkaskade fort, indem sie die Wirkungsweise ausgewählter zellulärer Proteine verändern. Zwei der häufigsten intrazellulären Mediatoren sind **cyclisches AMP** (cAMP) und **Ca^{2+}**: in den meisten Tierzellen wird die Veränderung der Konzentration von cAMP- oder Ca^{2+} über charakteristische Signalwege stimuliert, wobei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren den einen oder anderen Weg der Signalübertragung regulieren. Im folgenden sind für beide *second messenger* relevante Informationen aufgearbeitet worden.



128: Intrazelluläre Mediatoren wie cAMP oder Ca^{2+} sind letzendlich die Exekutoren der aktivierten G-Proteine

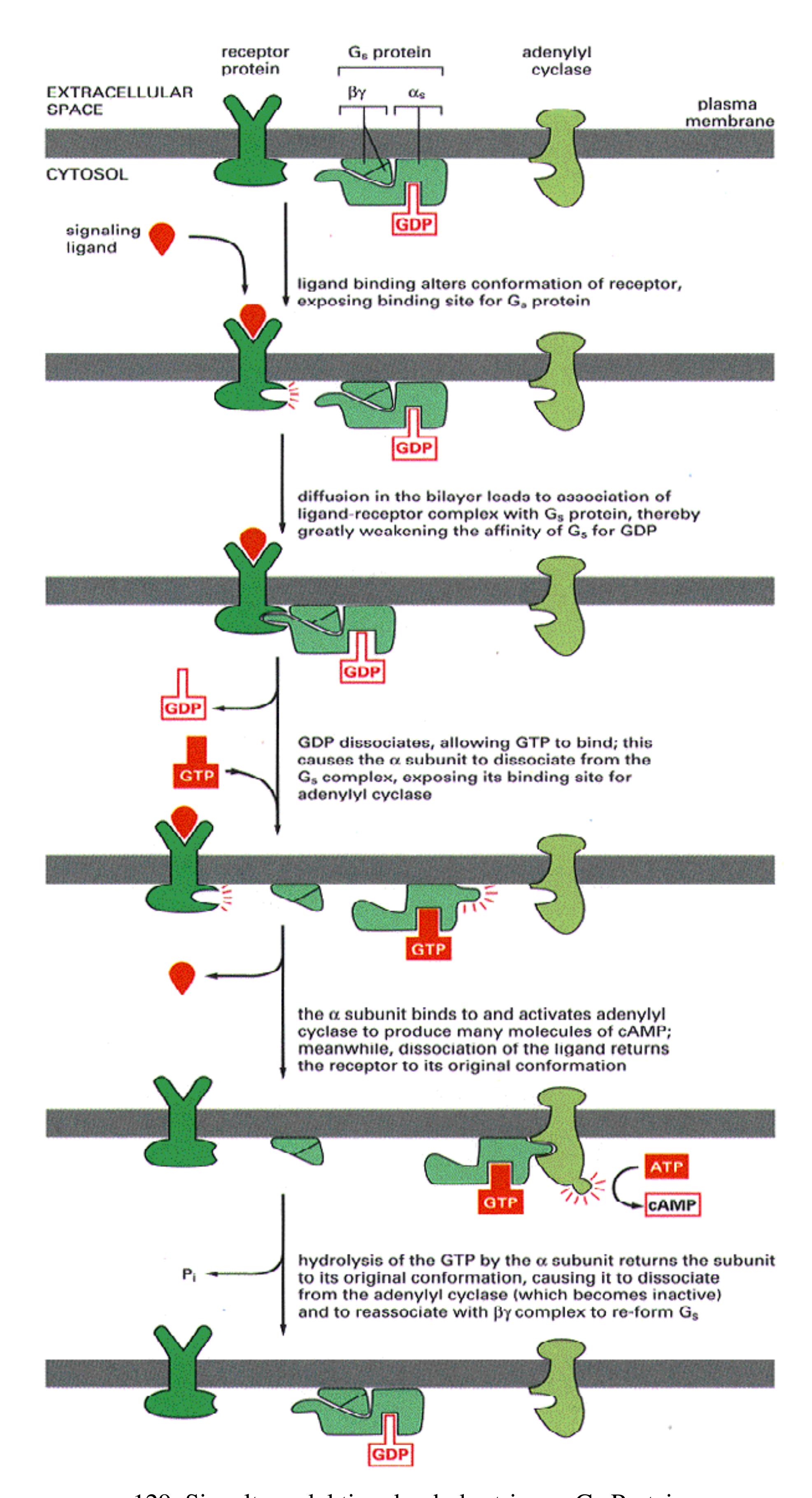
Cyclisches AMP wurde erstmals 1959 als intrazellulärer Mediator hormoneller Vorgänge identifiziert. Seither konnte es in allen untersuchten pro- und eukaryontischen Zellen als intrazelluläres Signalmolekül nachgewiesen werden. Um als intrazellulärer Mediator zu wirken, muß die intrazelluläre cAMP-Konzentration (normalerweise < 10^{-7} M) auf ein extrazelluläres Signal hin erniedrigt oder erhöht werden können: nach hormoneller Stimulation kann sich der cAMP-Spiegel innerhalb von Sekunden um das Fünffache verändern. Wie bereits erwähnt, ist ein System nur dann so empfindlich, wenn die rasche Synthese des entsprechenden Moleküls (hier cAMP) durch einen schnellen Abbau bzw. ein rasches Entfernen ausgeglichen wird. Cyclisches AMP wird - in einer vom Plasmamembran-gebundenen Enzym **Adenylatcyclase** katalysierten Reaktion - aus ATP gebildet und wird ständig schnell - durch (mindestens) eine cAMP-Phosphodiesterase - zu Adenosin-5'-monophosphat hydrolysiert (5'-AMP).

So, wie das gleiche Steroidhormon in verschiedenen Zielzellen unterschiedliche Wirkung erzielen kann, können auch verschiedene Zielzellen sehr unterschiedlich auf ein externes Signal reagieren, das den cAMP-Spiegel beeinflußt. Einige Beispiel sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Zielgewebe	**Hormon**	**Antwort**
Schilddrüse	TSH	Synthese und Sekretion von T_4
NNR	ACTH	Sekretion von Cortisol
Ovarien	LH	Sekretion von Progesteron
Muskeln	Adrenalin	Glykogenabbau
Knochen	Parathormon	Resorption von Knochen
Herz	Adrenalin	Erhöhung des Herschlages und Herzmuskelkontaktion
Leber	Glucagon	Glykogenabbau
Niere	Vasopressin	Resorption von Wasser
Fett	Adrenalin, ACTH Glucagon, TSH	Abbau von Triglyceriden

Bei einem bestimmten Zelltyp erzeugen jedoch alle Liganden, die die Adenylatcyclase aktivieren, meist die gleiche Wirkung. In Fettzellen, wird z.B. die Adenylatcyclase von mindestens 4 Hormonen aktiviert und jedesmal wird der Abbau von Lipiden eingeleitet.

Ein trimeres **stimulatorisches G-Protein** (G_S) setzt sich aus drei verschiedenen Polypeptidketten - den **α-, β- und γ-Untereinheiten** - zusammen. Damit Zellen auf Konzentrationsänderungen extrazellulärer Signalmoleküle schnell reagieren können, muß die Aktivierung der Adenylatcyclase sofort rückgängig gemacht werden, wenn der Rezeptor nicht mehr mit dem signalgebenden Liganden besetzt ist. Die kurze Halbwertszeit der aktiven Form wird dadurch gewährleistet, daß die Bindung an die Adenylatcyclase die GTPase-Aktivität der α-Unterheit stimuliert, so daß das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert werden kann. Anschließend assoziieren die Untereinheiten wieder, um ein inaktives G_S-Molekül zu bilden:



129: Signaltransduktion durch das trimere G_S-Protein

Die Bedeutung der GTPase-Aktivität für das Abschalten des Prozesses kann experimentell veranschaulicht werden. Wenn man Zellen aufschließt und mit einem **GTP-Analogon** (GTPγs: terminale Phosphatgruppe nicht abspaltbar) behandelt, dauert die cAMP-Synthese nach Stimulierung mit einem bestimmten Hormon deutlich länger an. Das gleiche Phänomen läßt sich bei Patienten beobachten, die an **Cholera** erkrankt sind. Der bakterielle Giftstoff, der die Symptome der Krankheit hervorruft, inhibiert den Selbst-Inaktivierungsmechanismus. Das **Choleratoxin** katalysiert die Übertragung einer ADP-Ribose von intrazellulären NAD^+ auf die α-Unterheit, was zur Folge hat, daß das gebundene GTP nicht mehr hydrolysiert werden kann. Adenylatcyclase, die über so modifizierte α-Untereinheiten aktiviert wird, bleibt permanent in einem aktivierten Zustand. Die infolgedessen ständige Erhöhung des cAMP-Spiegels führt in Epithelzellen des Verdauungstraktes zu einem erheblichen Na^+ und Wasserausstrom in das Darmlumen. Dies erklärt den schweren Durchfall, der bei der Cholera auftritt.

Ein trimeres **inhibitorisches G-Protein** (G_i) setzt sich ebenfalls aus drei verschiedenen Polypeptidketten zusammen, kann aber Adenylatcyclase hemmen. Dadurch kann ein Ligand in Abhängigkeit der vorhandenen Rezeptorausstattung einer Zelle entweder zur Erhöhung oder Absenkung des intrazellulären cAMP-Spiegels führen.

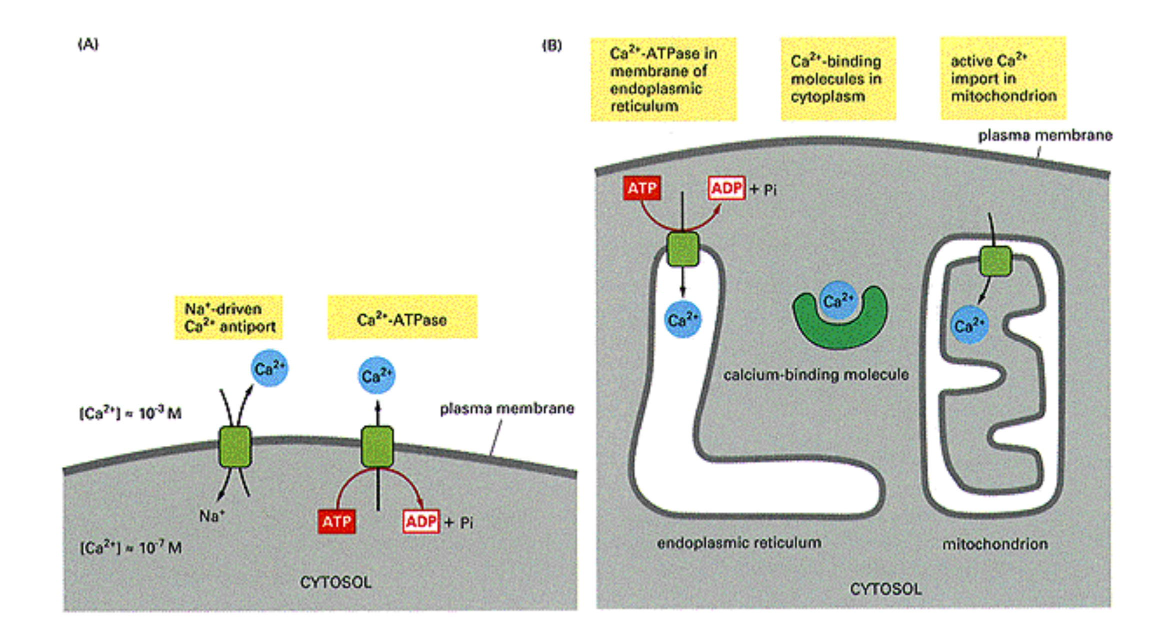
Beispielsweise führt **Adrenalin** zur Aktivierung der Adenylatcyclase, wenn es an einen **β-adrenergen Rezeptor** bindet. Bindet es jedoch an einen **α_2-adrenergen Rezeptor**, inhibiert Adrenalin das Enzym. Dieses Phänomen läßt sich darauf zurückführen, daß es unterschiedliche G-Proteine gibt, die die jeweiligen Rezeptoren an das Enzym koppeln. Während der ß-adrenerge Rezeptor über G_s funktionell mit der Adenylatcyclase verbunden ist, werden α_2-adrenerge Rezeptoren über ein inhibitorisches G_i-Protein an das Enzym gekoppelt.

Ein weiteres Beispiel ist das **Pertussistoxin**, das die ADP-Ribosylierung der α-Untereinheit katalysiert und dabei die GTPase-Aktivität des G_i-Moleküls blockiert. Die ADP-ribosylierte Form der α-Unterheit unterbindet eine effiziente Wechselwirkung des G_i-Komplexes mit den entsprechenden Rezeptoren. Der Komplex bleibt an GDP gebunden und ist unfähig, die Adenylatcyclase zu hemmen, bzw. Kaliumkanäle zu öffnen. Das Resultat: Pertussis convulsiva (Keuchhusten).

Der zweite wichtige *second messenger* innerhalb von Zellen ist **intrazelluläres Ca^{2+}**. Dazu wird in jeder Zelle die Konzentration an freiem Ca^{2+} im Cytosol sehr niedriggehalten (**$<10^{-7}$ M**), während sie im extrazellulären Raum (**$\sim10^{-3}$ M**) und Endoplasmatischen Reticulum (ER) relativ hoch ist. Dadurch ensteht sowohl an der Plasma- als auch an der ER-Membran ein Konzentrationsgefälle. Wenn ein Signal vorübergehend Ca^{2+}-Kanäle in der einen oder anderen Membran öffnet, strömt Ca^{2+} in das Cytosol ein und führt zu einer drastischen Erhöhung der lokalen Ca^{2+}-Konzentration, wodurch Ca^{2+}-abhängige Proteine in der Zelle aktiviert werden.

In der Plasmamembran aller eukaryontischen Zellen befinden sich **Ca^{2+}-ATPasen**. Sie hydrolysieren ATP und benutzen die dabei freiwerdende Energie, um überschüssiges Ca^{2+} aus dem Cytosol herauszupumpen. **Muskel-** und **Nervenzellen**, die sehr extensiv von der Ca^{2+}-Regulation Gebrauch machen, besitzen eine **zusätzliche Ca^{2+}-Pumpe**, die den Ca^{2+}-Ausstrom an den Einstrom von Na^+ koppelt (Antiporter). Dieser Ca^{2+}/Na^+-Austauscher hat eine relativ niedrige Affinität für Ca^{2+}, so daß optimale Bedingungen für einen Austausch nur dann gegeben sind, wenn der cytosolische Ca^{2+}-Spiegel im Vergleich zum Normalwert um das Zehnfache angestiegen ist. Dies ist bei wiederholter Stimulierung von Muskel- bzw. Nervenzellen der Fall. Auch die Wirkung einer **Ca^{2+}-Pumpe in der ER-Membran** hält die cytosolische Ca^{2+}-Konzentration niedrig: über diese Ca^{2+}-ATPase nimmt das ER entgegen dem Konzentrationsgefälle große Mengen an Ca^{2+} selbst dann aus dem Cytosol auf, wenn der Ca^{2+}-Spiegel im Cytosol schon niedrig ist. Die Konzentration von **freiem Ca^{2+}** im Cytosol schwankt zwischen **10^{-7} M** im Ruhezustand und **5×10^{-6} M**

nach Aktivierung durch ein extrazelluläres Signal. Ist eine Zelle aufgrund einer **Schädigung** nicht in der Lage, Ca^{2+} effizient aus dem Cytoplasma zu befördern, steigt die Konzentration auf gefährlich hohe Werte an (**>10^{-5} M**). In diesem Fall tritt eine **Ca^{2+}-Pumpe** der **inneren Mitochondrien-Membran** in Aktion. Sie hat eine niedrige Affinität, arbeitet aber mit hoher Kapazität, und nimmt das überschüssige Calcium unter Ausnutzung des elektrochemischen Gradienten, der durch Elektronenübertragungen bei der oxidativen Phosphorylierung entsteht, aus dem Cytosol auf.

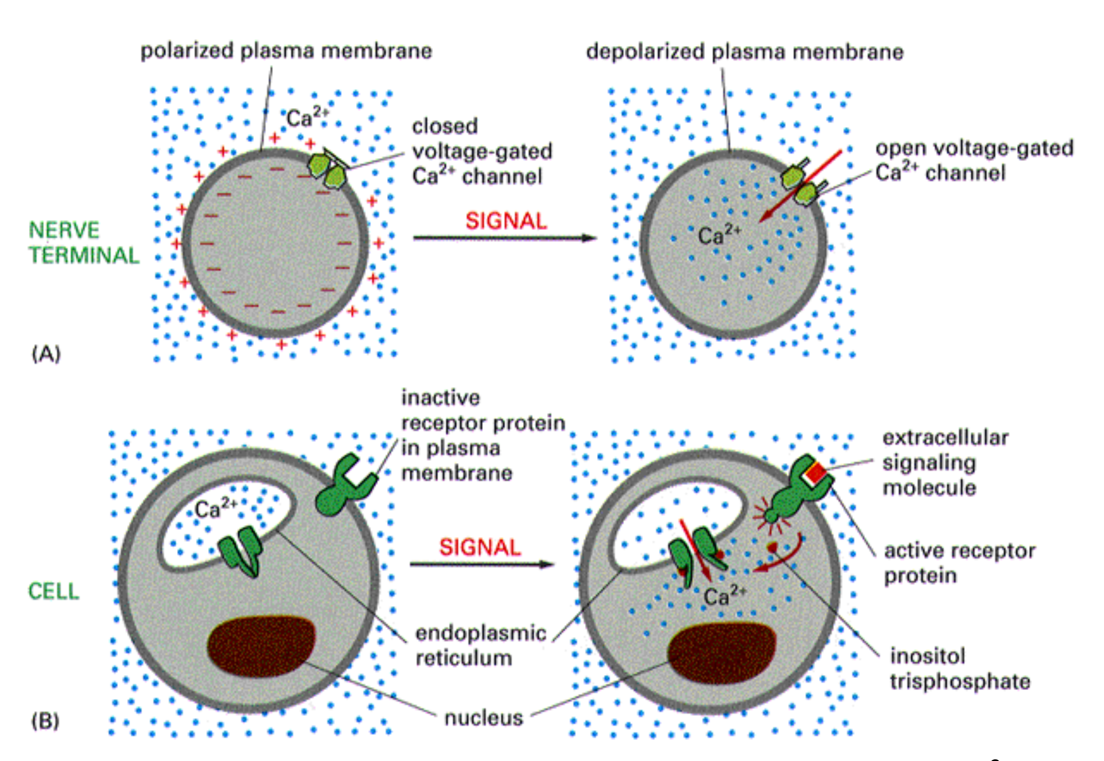


130: Intrazellulärer Ca^{2+}-Stoffwechsel

Der erste direkte Hinweis dafür, daß **Ca^{2+} als intrazellulärer Signalübermittler** dient, stammt aus einer Untersuchung, die im Jahr **1947** durchgeführt wurde: die Injektion einer geringen Menge Ca^{2+} in eine Skelettmuskel-Zelle bewirkt, daß diese sich zusammenzieht. In den letzten Jahren stellte sich heraus, daß Ca^{2+} als intrazellulärer Botenstoff an vielen anderen Prozessen einschließlich **Sekretion**, **Zellwachstum** und **Apoptose** beteiligt ist.

Zwei **Ca^{2+}-abhängige Signalübertragungswege** sind bekannt; der eine spielt sich vor allem in elektrisch erregbaren Zellen ab, der andere kommt in allen eukaryontischen Zellen vor. Ersterer wurde besonders gut in Nervenzellen untersucht. Die Depolarisation der Plasmamem-

bran verursacht, daß Ca^{2+} in das Nervenende einströmt, was wiederum die Ausschüttung von Neutrotransmittern zur Folge hat; das Ca^{2+} strömt durch spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle ein, die sich öffnen, wenn die Plasmamembran des Nervenendes durch ein ankommendes Aktionspotential depolarisiert wird. Im zweiten, ubiquitären Signalübertragungsweg bewirkt die Bindung von extrazellulären Signalmolekülen an Oberflächenrezeptoren die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER. Die Vorgänge an der Zelloberfläche sind mit dem Öffnen der Ca^{2+}-Kanäle im ER über einen anderen intrazellulären Botenstoff (**Inositoltrisphosphat)** verbunden.

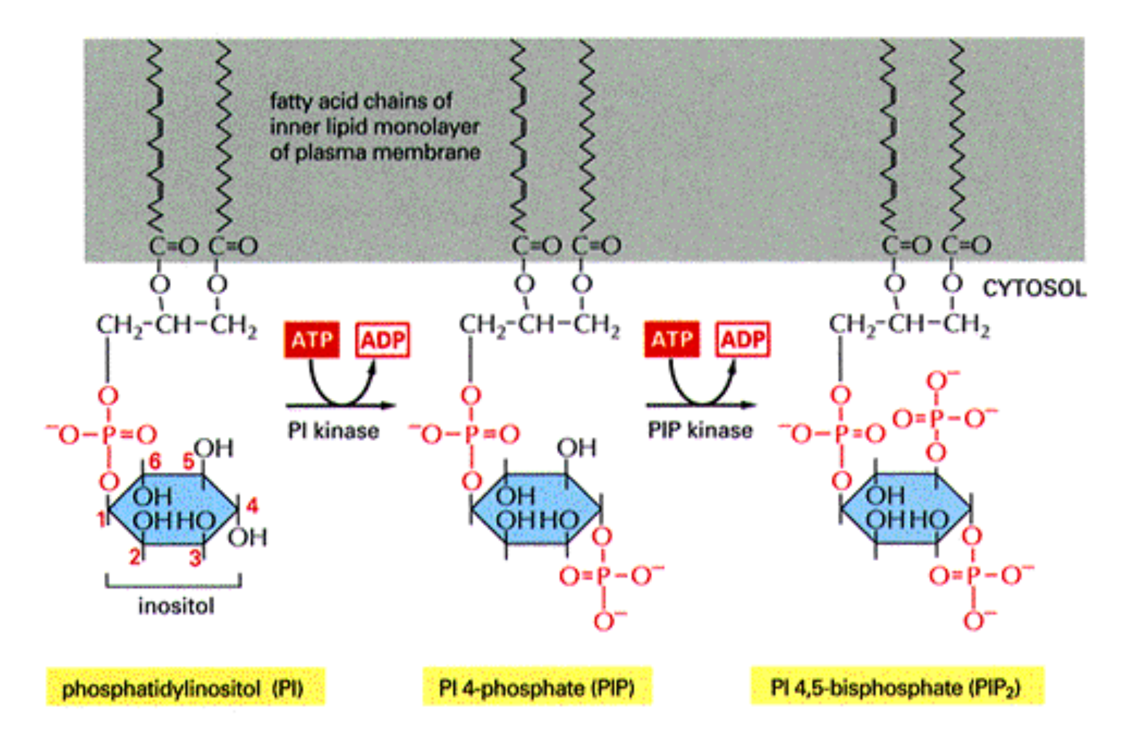


131: Extrazelluläre Signale fördern die Erhöhung von intrazellulärem Ca^{2+}

- **INOSITOL-PHOSPHOLIPID-WEG**

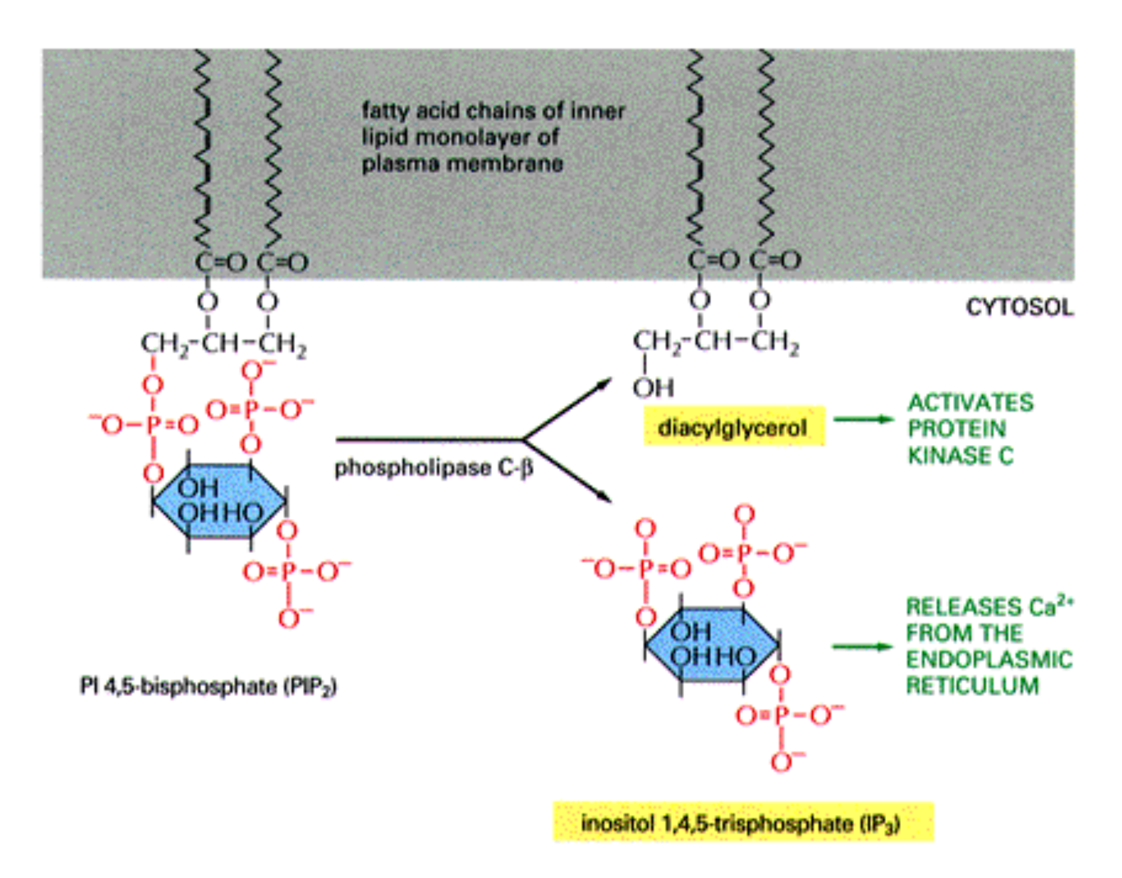
  Daß **Inositol-Phospholipide** (Phosphoinositide) an der Signalübertragung beteiligt sein könnten, wurde zum ersten Mal **1953** postuliert. Damals stellte sich heraus, daß einige extrazelluläre Signale den Einbau von radioaktivem Phosphat in Phosphatidylinositol (PI) auslösen. PI ist ein Bestandteil der Plasmamembran, der in geringen Mengen vorkommt. Später fand man, daß zuerst der Abbau von Inositol-Phospholipiden stattfindet, bevor radioaktives Phosphat durch Neusynthese ein-

gebaut wird. Die für die Signalübertragung wichtigsten Inositol-Phospholipide sind zwei Derivate des PI, **PI-Phosphat** (PIP) und **PI-Bisphosphat**(PIP_2), die man vorwiegend in der inneren Lipidschicht der Plasmamembran vermutet. Obwohl PIP_2 in Säugerzellmembranen in geringeren Mengen vorkommt als PI, kommt der Hydrolyse von PIP_2 die größere biologische Bedeutung zu.



132: Inositol-Phospholipide (Phosphoinositide)

Die Kette der Ereignisse, die zum Zerfall von PIP_2 führen, beginnt mit der Bindung eines Signalmoleküls an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor in der Plasmamembran. Mehr als 25 verschiedene Zelloberflächen-Rezeptoren benutzen diesen Übertragungsweg. Obwohl man die Einzelheiten dieses Aktivierungsweges nicht so gut versteht, wie die des cAMP, nimmt man an, daß sich der gleiche mehrstufige Prozeß in der Plasmamembran abspielt: ein aktivierter Rezeptor stimuliert ein trimeres G-Protein, das wiederum eine Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C, die sogenannte **Phospholipase C-ß**, aktiviert. In weniger als einer Sekunde spaltet dieses Enzym PIP_2 in zwei Produkte: **Inositoltrisphosphat** und **Diacylglycerol** (DAG).



133: Aktivierung von PIP_2 in DAG und IP_3

Das durch Hydrolyse von PIP_2 entstehende Inositoltrisphosphat (IP3) ist ein kleines, wasserlösliches Molekül, das die Plasmamembran verläßt und rasch ins Cytosol diffundiert. Es bindet an IP_3-abhängige Ca^{2+}-Kanäle der ER-Membran und löst dadurch die Ausschüttung von Ca^{2+} aus. In ihrer Struktur ähneln diese Kanäle den Ca^{2+}-Kanälen im Sarkoplasmatischen Reticulum von Muskelzellen, die Ca^{2+} ausschütten und dadurch die Muskelkontraktion auslösen. Beide Arten von Kanälen werden durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus reguliert: freigewordenes Ca^{2+} bindet selbst wieder an den Rezeptor und verstärkt den Ca^{2+}-Ausstrom, so daß es - in einer Alles-oder-Nichts-Reaktion - zur plötzlichen Ausschüttung von Ca^{2+} kommt.

Es gibt zwei Mechanismen, die die ausgelöste Ca^{2+}-Reaktion beenden: (1) IP_3 wird durch spezifische Phosphatasen rasch dephosphoryliert (und dabei inaktiviert); (2) Ca^{2+} wird rasch aus dem Cytosol herausbefördert.

Nur ein Teil des IP_3 wird dephosphoryliert, der Rest wird stattdessen zu **Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat** (**IP_4**) phosphoryliert, das in der Zelle langsamere und länger andauernde Reaktionen vermittelt, bzw. bewirkt, daß die Ca^{2+}-Speicher der Zelle mit Ca^{2+} aus der extrazellulären Flüssigkeit wieder aufgefüllt werden. Das Enzym, das die Herstellung von IP_4 katalysiert, wird durch den IP_3-vermittelten Anstieg der cytosolischen Ca^{2+}-Konzentration aktiviert, was bedeutet, daß die Menge an IP_3 durch eine Art negativer Rückkopplung reguliert wird.

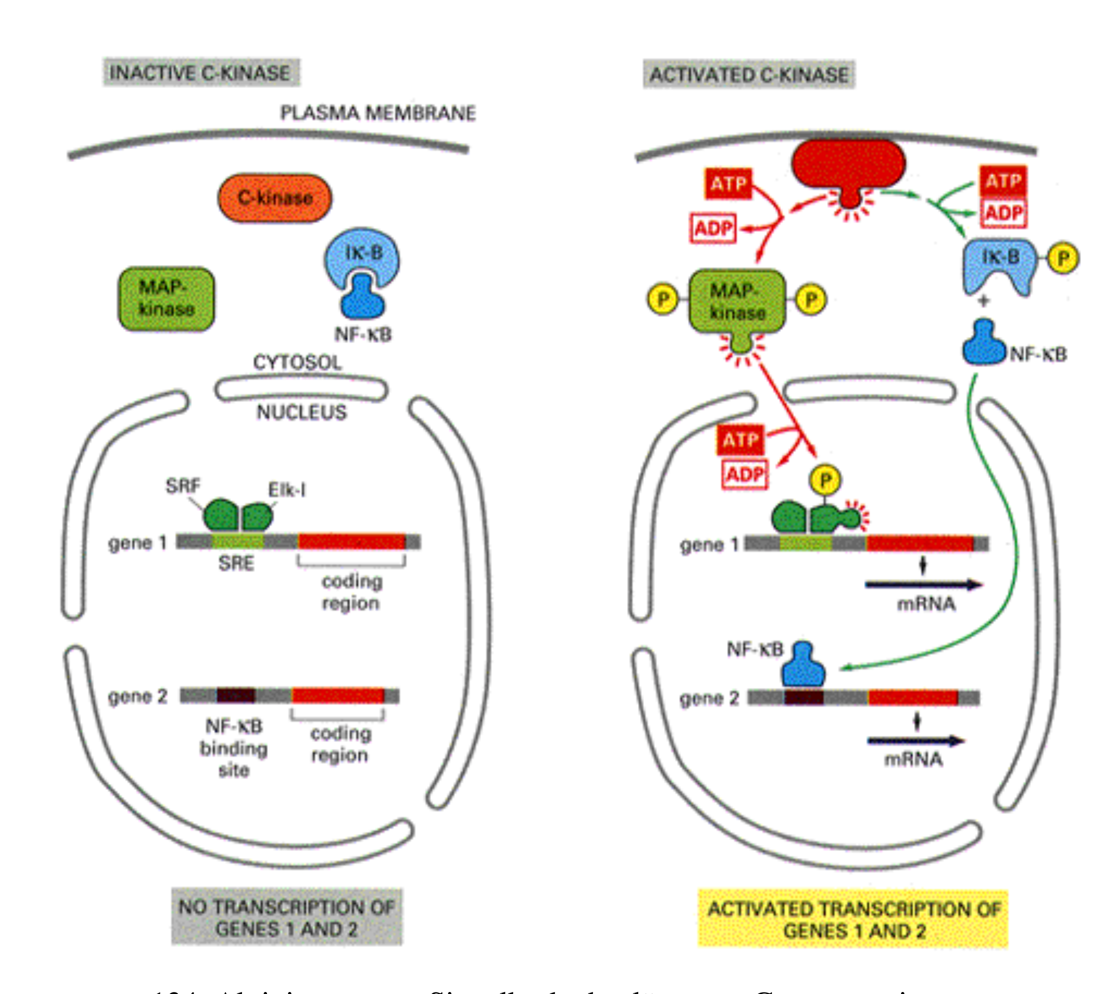
Die Hydrolyse von PIP_2 führt zum IP_3, das die Ca^{2+}-Konzentration im Cytosol erhöht. Gleichzeitig hat das zweite Spaltprodukt von PIP_2 - **Diacylglycerol** - ganz andere Wirkungen. Diacylglycerol kann zwei mögliche Signalfunktionen ausüben. Zum einen kann es weiter zersetzt werden, wobei **Arachidonsäure** entsteht. Diese kann entweder selbst als Botenstoff dienen, oder zur Synthese von **Eicosanoiden** verwendet werden. Die bedeutendere Funktion von Diacylglycerol ist jedoch die Aktivierung einer wichtigen **Serin/Threonin-Proteinkinase**, die ausgewählte Proteine in der Zielzelle phosphoryliert.

Die Serin/Threonin-Proteinkinase, die von Diacylglycerol aktiviert wird, ist die **Proteinkinase C** (**PKC**; arbeitet **C**a^{2+}-abhängig). Der von IP_3 ausgelöste Anstieg des cytoplasmatischen Ca^{2+}-Spiegels führt vermutlich zu einer Veränderung der Kinase im Cytosol, so daß sie sich an die Innenseite der Plasmamembran anlagern kann. Dort wird sie unter dem gemeinsamen Einfluß von Ca^{2+}, Diacylglycerol und dem negativ geladenen Membran-Phospholipid Phosphatidylserin aktiviert. Von den acht oder mehr Isoformen der PKC, die es in Säugern gibt, werden mindestens vier über Diacylglycerol aktiviert.

Das durch die Spaltung von PIP_2 entstandene Diacylglycerol kann die Aktivierung der PKC nicht lange aufrechterhalten, da das Molekül schnell verstoffwechselt wird. Für Langzeiteffekte wie Zellteilung oder Differenzierung wäre jedoch eine langandauernde Aktivierung der PKC notwendig. Dies hängt von einem zweiten Diacylglycerol-Produktionsstoß ab, der durch eine **Phospholipase-katalysierte Spaltung** des Membran-Hauptphospholipids Phosphatidylcholin ausgelöst wird.

Aktivierte PKC phosphoryliert spezifische Serin- oder Threoninreste bestimmter Zielproteine, die von Zelltyp zu Zelltyp verschieden sind. Die höchste Konzentration an PKC findet man im Gehirn, wo sie (unter anderem) in Nervenzellen bestimmte Ionenkanäle phosphoryliert. Dadurch werden deren Eigenschaften und mit ihnen die Erregbarkeit der Nervenzell-Plasmamembran verändert.

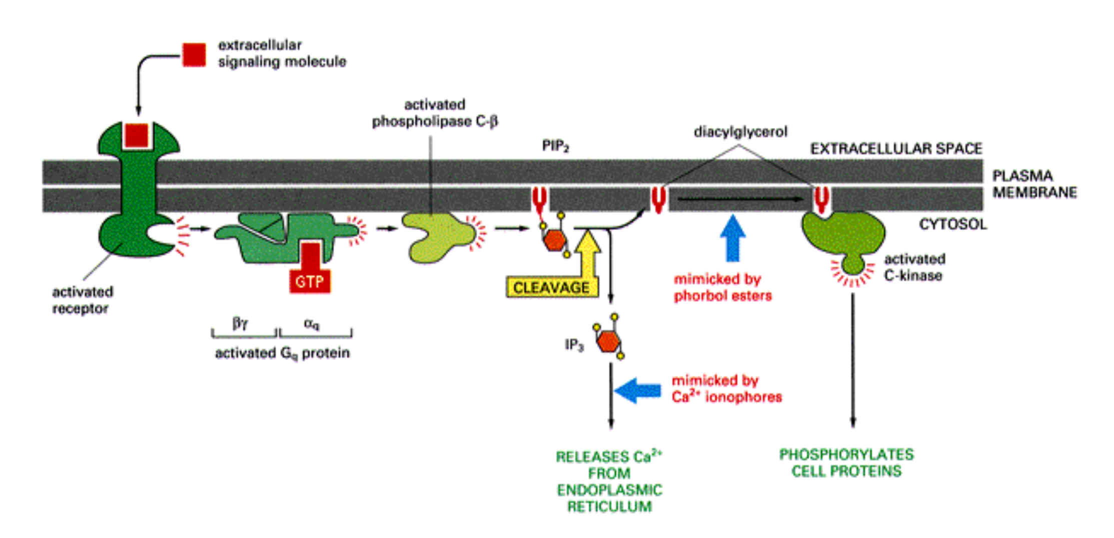
In vielen Zellen führt die Aktivierung der PKC zu einem Anstieg der Transkription spezifischer Gene. Dafür gibt es mindestens zwei Mechanismen. In einem Fall aktiviert die C-Kinase eine Proteinkinase-Kaskade, die zur Phosphorylierung und Aktivierung eines DNA-gebundenen, genregulatorischen Proteins führt. Im anderen Fall phosphoryliert die PKC ein inhibitorisches Protein, so daß ein cytoplasmatisches genregulatorisches Protein freigesetzt wird, in den Kern einwandert und die Transkription eines spezifischen Gens auslöst.



134: Aktivierung von Signalkaskaden löst neue Genexpression aus

Die Wege der Inositol-Phospholipid-Signaltransduktion können durch die Zugabe von pharmakologischen Substanzen nachgeahmt werden. Die Wirkungen von IP_3 können durch Ca^{2+}-Ionophore wie **A23187** oder **Ionomycin** ausgelöst werden; diese Substanzen bewirken die Aufnahme von Ca^{2+} aus der extrazellulären Flüssigkeit in das Cytosol.

Pflanzliche Produkte, wie **Phorbolester**, ahmen die Wirkungen von Diacylglycerol nach, indem sie an die PKC binden und diese dadurch unmittelbar aktivieren. Mit Hilfe dieser Substanzen konnte gezeigt werden, daß beide Übertragungswege oft zusammenarbeiten, um eine vollständige zelluläre Reaktion auszulösen. Manche Zellen lassen sich zum Beispiel in Kultur durch die gleichzeitige Zugabe von Ca^{2+}-Ionophor und PKC-Aktivator zur Proliferation anregen, was durch die Zugabe einer einzigen Substanz nicht erreicht werden kann.



135: Künstliche Induktoren simulieren eine Aktivierung von Signalkaskaden

Da die Konzentration an freiem Ca^{2+} im Cytosol gewöhnlich $<10^{-7}$ M ist und im allgemeinen, selbst wenn die Zelle durch Ca^{2+}-Einstrom aktiviert ist, nicht über 6×10^{-6} M ansteigt, muß jede zelluläre Struktur, die einer direkten Ca^{2+}-abhängigen Regulation unterworfen ist, eine Affinitätskonstante (K_a) für Ca^{2+} von ungefähr 10^6 Liter/mol aufweisen. Da darüber hinaus die Konzentration an freiem Magnesium recht konstant 10^3 M beträgt, müssen Ca^{2+}-Bindestellen selektiv Ca^{2+} etwa 1000-mal besser erkennen als Mg^{2+}. Es gibt mehrere spezifische Ca^{2+}-bindende Proteine, die diese Bedingungen erfüllen.

Das erste Ca^{2+}-bindende Protein, das entdeckt wurde, war das **Troponin C** in Muskelzellen. Ein eng verwandtes Protein ist **Calmodulin**, das in allen untersuchten Säugerzellen vorkommt. Eine typische Säugerzelle enthält mehr als **10^7 Calmodulin-Moleküle**. Calmodulin ist ein vielseitiger, intrazellulärer Ca^{2+}-Rezeptor, der viele verschiedene Ca^{2+}-regulierte Prozesse vermittelt. Es ist ein hochkonserviertes Protein (ca. 150 Aminosäuren), das vier hochaffine Ca^{2+}-Bindestellen trägt und einer Konformationsänderung unterliegt, wenn es Ca^{2+} bindet.

Ca^{2+}-Ionen ermöglichen die Bindung von Calmodulin an **verschiedene Zielproteine** in der Zelle, deren Aktivität dadurch verändert wird. Unter den Zielproteinen, die durch Ca^{2+}/Calmodulin reguliert werden, befinden sich **viele Enzyme** und **Membrantransportproteine**, sowie die **Plasmamembran-Ca^{2+}-ATPase** und verschiedene **CaM-Kinasen** (Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Protein-Kinasen).

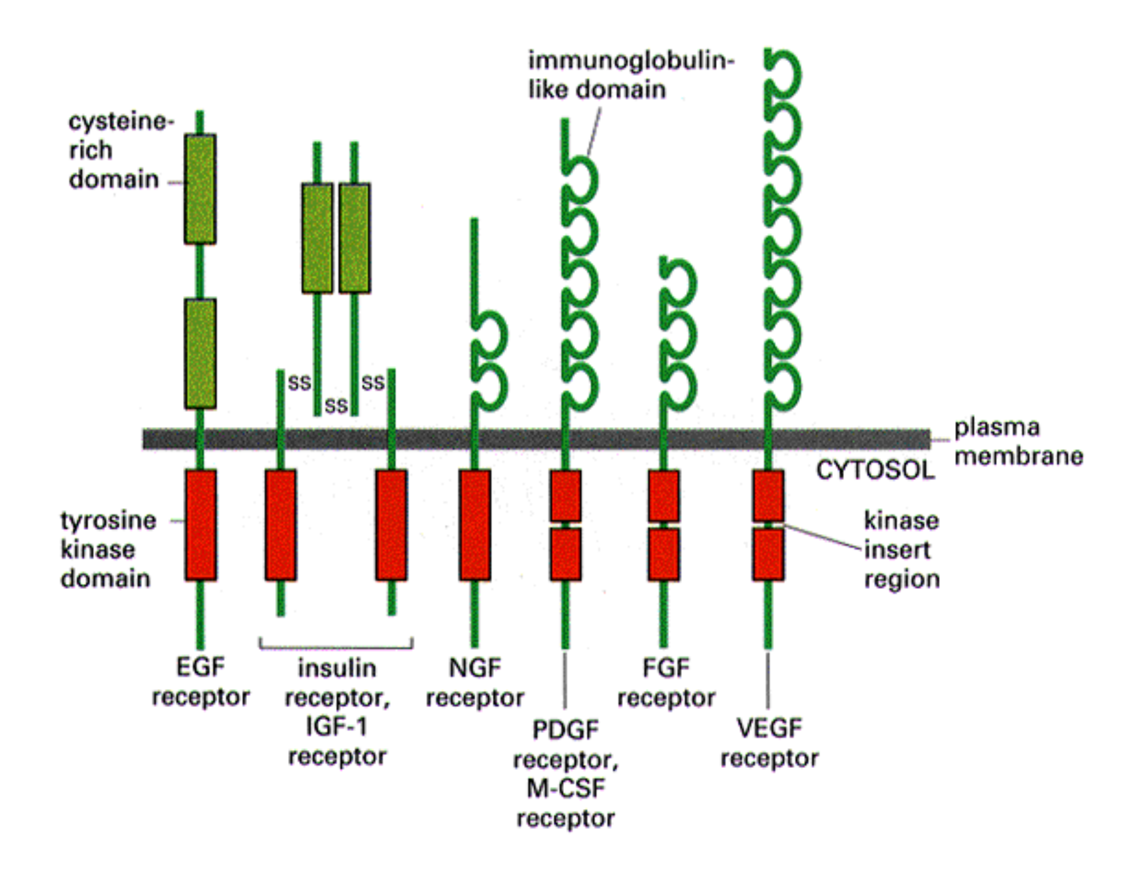
- **KATALYTISCHE REZEPTOREN**

  Das erste Rezeptorprotein, das (1982) als **Tyrosin-spezifische Proteinkinase** identifiziert wurde, war der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (**EGF-R**). EGF selbst ist ein kleines Protein (53 AS), das das Wachstum von epidermalen und anderen Zellen anregt. Der dazugehörige Rezeptor durchspannt einmal die Membran und hat einen **großen extrazellulären Teil**, der glykosyliert ist und EGF bindet. Durch die Bindung von EGF wird der **intrazelluläre Teil**, eine Tyrosin-Kinase, **aktiviert**. Die aktivierte Enzymdomäne überträgt eine Phosphatgruppe von ATP auf bestimmte Tyrosin-Seitenketten, und zwar sowohl auf den Rezeptor selbst, als auch auf andere spezifische zelluläre Proteine. Viele Rezeptoren für andere Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren sind auch Rezeptor-Tyrosinkinasen. Dazu gehören die **Rezeptoren** für

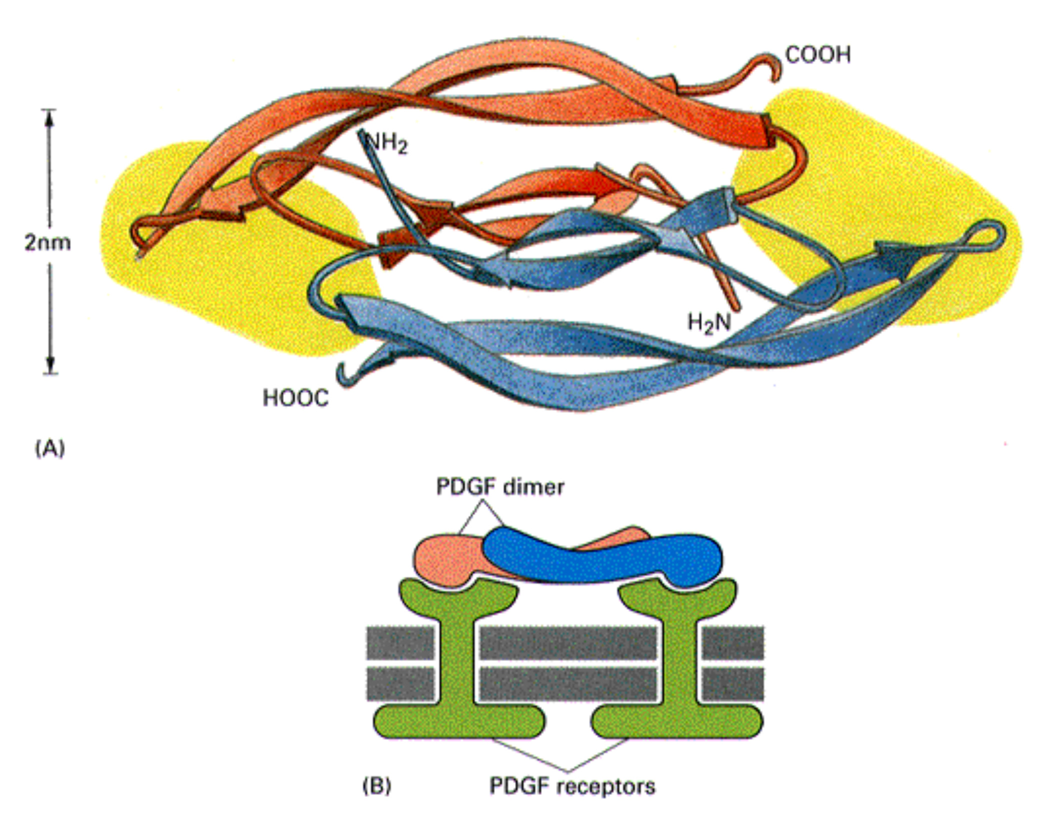
  platelet-derived growth factor (**PDGF**)
  fibroblast growth factors (**FGFs**)
  hepatocyte growth factor (**HGF**)
  insulin-like growth factor 1 (**IGF-1**)
  nerve growth factor (**NGF**)
  vascular endothelial growth factor (**VEGF**)
  macrophage colony stimulating factor (**M-CSF**)

  Die Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen kann in eine Reihe von Unterfamilien unterteilt werden. Alle diese Rezeptoren können sich nach Bindung ihrer Liganden "**autophosphorylieren**".

  Wie bewirkt die Bindung eines spezifischen Proteins an den extrazellulären Teil der Rezeptor-Tyrosinkinase die Aktivierung der katalytischen Domäne auf der anderen Seite der Plasmamembran? Des Rätsels Lösung ist, daß die Bindung an den Liganden die **Dimerisierung des Rezeptors** bewirkt; dadurch können sich die beiden cytoplasmatischen Domänen **gegenseitig** an mehreren Tyrosin-Resten **phosphorylieren**. Diese gegenseitige Phosphorylierung wird als **Autophosphorylierung** bezeichnet, da sie im Rezeptor-Dimer stattfindet.



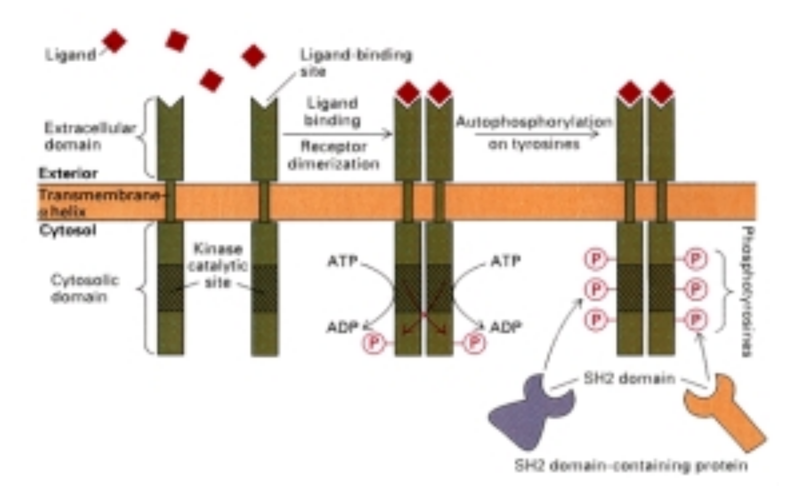
136: Übersicht über die verschiedenen Familien der Tyr-PTK



137: PDFG bindet an den PDGF-Rezeptor und vernetzt ihn

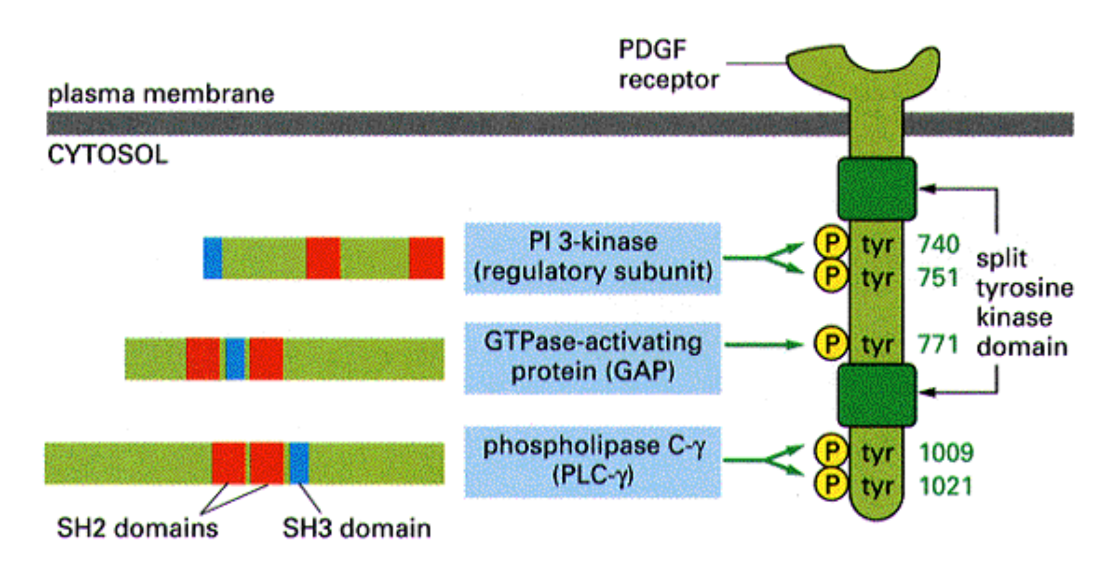
Bemerkung: Man kann die Tatsache, daß die Rezeptoren dimerisieren, experimentell zur Inaktivierung spezifischer Rezeptoren nutzen, um deren Bedeutung in einer bestimmten zellulären Antwort zu untersuchen. Hierzu transfiziert man Zellen mit einer DNA, die für eine veränderte Form des Tyrosin-Kinase-Rezeptors kodiert, der zwar noch dimerisieren kann, dessen Kinase-Domäne jedoch inaktiv ist. Wird ein solches Molekül in großen Mengen zusammen mit normalem Rezeptor ausgeprägt, wirkt sich der modifizierte Rezeptor **dominant-negativ** aus und macht den normalen Rezeptor dadurch funktionsunfähig, indem er mit ihm zusammen ein inaktives Dimer bildet.

Die Signalübertragungswege, die durch EGF-, PDGF- und FGF-Rezeptoren in Gang gesetzt werden, sind bis in das kleinste Detail untersucht worden. In allen Fällen dienen die **autophosphorylierten Tyrosin-Reste** als hochaffine Bindestellen für eine Reihe intrazellulärer **Signalproteine** der Zielzelle. Jedes dieser Proteine bindet an einen anderen phosphorylierten Tyrosin-Rest des aktivierten Rezeptors; zur Erkennung des Phosphotyrosins ist also auch dessen unmittelbare Umgebung von Bedeutung. Viele dieser Proteine **werden** nach der Bindung an den Rezeptor **selbst** an Tyrosin-Resten **phosphoryliert** und dadurch aktiviert. **Generell gilt:** eine Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten dient als Schaltmechanismus, der die vorübergehende Bildung eines intrazellulären Signalkomplexes auslöst. Verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen binden unterschiedliche Kombinationen von Signalproteinen, so daß unterschiedliche Antworten ausgelöst werden.



138: Ligandenbindung führt zur Dimerisierung und anschl. Autophosphorylierung

Die intrazellulären Signalproteine, die an Phosphotyrosine aktivierter Rezeptor-Tyrosinkinasen binden, besitzen unterschiedliche Struktur und haben unterschiedliche Funktionen. Dennoch zeichnen sich alle durch zwei hochkonservierte, nicht-katalytische Domänen aus, die man als **SH2** und **SH3** bezeichnet (leitet sich von Src-Homologie-Region 2 und 3 ab).



139: Verschiedene Signalroteine binden an einen phosphorylierten PDFGR

Die **SH2-Domänen erkennen phosphorylierte Tyrosine** und ermöglichen den Proteinen, die solche Domänen besitzen, sowohl an aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinasen als auch an andere intrazelluläre Signalproteine zu binden, die vorübergehend an Tyrosin-Resten phosphoryliert wurden. Die Bedeutung der SH3-Domäne ist weniger klar; man glaubt jedoch, daß sie in der Zelle an andere Proteine bindet.

Die Annahme, daß die SH3-Domäne Proteine bindet, wird durch die Studien an einer Gruppe von kleinen „**Adapter**"-Proteinen belegt, die nur aus SH2- und SH3-Domänen bestehen. Diese kleinen SH2/3-Adapter-Proteine besitzen selbst keine katalytische Aktivität, sondern werden dazu verwendet, tyrosinphosphorylierte Proteine - wie aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinasen - mit anderen Proteinen, die selbst keine eigene SH2- oder SH3-Domäne besitzen, zu verbinden.

Die Ras-Proteine gehören der großen Ras-Großfamilie **monomerer GTPasen** an, zu der zwei weitere Unterfamilien gehören: (1) die Rho- und Rac-Proteine, die bei der Signalübertragung von Oberflächenrezeptoren zum Actin-Cytoskelett eine Rolle spielen, sowie (2) die Rab-Familie, deren Mitglieder an der Regulation des vesikulären Transports beteiligt sind.

Wie fast alle dieser monomeren GTPasen enthalten die Ras-Proteine einen kovalent verknüpften **Prenyl-Rest**, der für ihre **Verankerung in der Membran** wichtig ist. Ras-Proteine liegen an der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran, wo sie auch ihre Funktion ausüben.

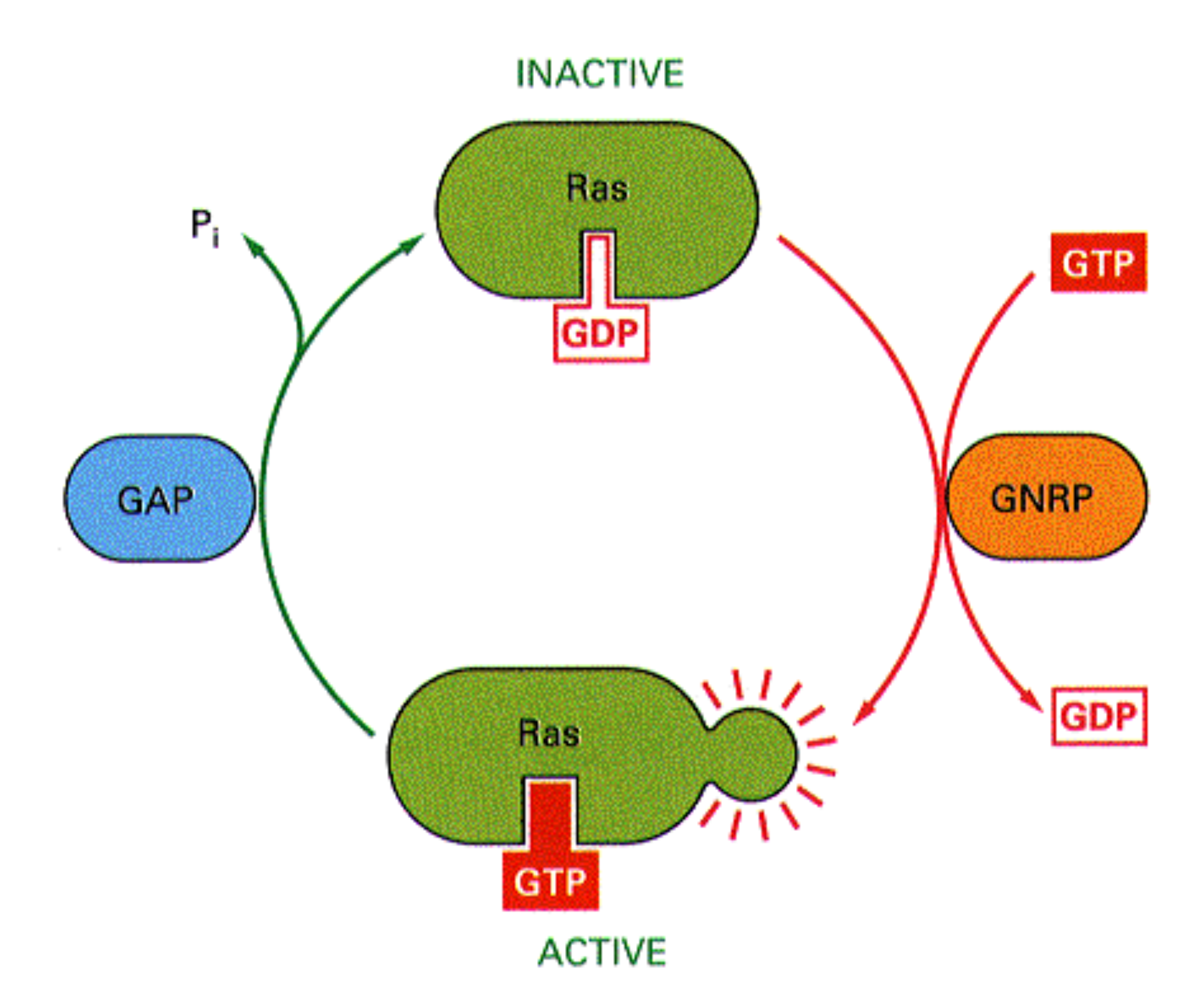
Die Ras-Proteine unterstützen die Signalübertragung von Rezeptor-Tyrosinkinasen zum Kern, die normalerweise das Zellwachstum oder eine Differenzierung auslösen. Wenn die Funktion von Ras durch Mikroinjektion neutralisierender Anti-Ras-Antikörper oder über dominant-negative Formen von Ras **blockiert** wird, findet die normalerweise durch aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinasen ausgelöste Zellwachstums- oder Differenzierungsantwort **nicht** mehr statt.

Auf der anderen Seite hat die Einführung einer **hyperaktiven** Ras-Mutante in die Zelle die gleiche Wirkung auf Teilung oder Differenzierung, die durch eine kontinuierliche Bindung eines Liganden am Oberflächenrezeptor zustande käme. Tatsächlich wurden die Ras-Proteine ursprünglich als hyperaktive Produkte mutanter *ras*-Gene entdeckt, die die normale Kontrolle des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung durchbrechen und dadurch die Entstehung von **Krebs** auslösen; in ungefähr 30% der menschlichen Tumoren kann man Mutationen in *ras*-Genen nachweisen.

Wie die anderen monomeren GTPasen und trimeren G-Proteine, besitzen auch Ras-Proteine **Schalterfunktion** und wechseln zwischen zwei Konformationszuständen - als GTP-gebundene Moleküle sind sie **aktiviert**, während sie in der GDP-gebundenen Form **inaktiv** sind.

Ras-Proteine **hydrolysieren GTP** mindestens hundertmal langsamer als die α-Untereinheit des trimeren G-Proteins (siehe Seite 170). Da GTP im Vergleich zu GDP in etwa 10-fach höherer Konzentration im

Cytoplasma vorliegt, bedeutet das, daß Ras, wenn es keinem anderen Einfluß unterliegt, ständig aktiv bleibt, wenn es einmal in der GTP-gebundenen Form vorliegt. In der Zelle ist es jedoch so, daß zwei Gruppen von Signalproteinen den Aktivitätszustand von Ras regulieren, indem sie den Übergang zwischen aktiviertem und inaktivem Zustand beeinflußen - **GTPasen-aktivierende Proteine** (**GAPs**) erhöhen die Hydrolysegeschwindigkeit des Ras-gebundenen GTP, wodurch Ras inaktiviert wird. Den negativen Regulatoren wirken die **Guaninnucleotid-freisetzenden Proteine** (**GNRPs**) entgegen, die den Austausch von gebundenem GDP gegen GTP aus dem Cytosol fördern.

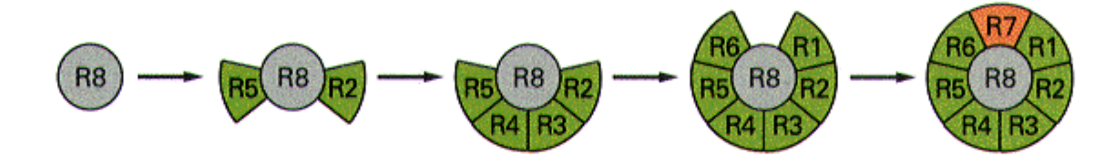


140: Der Ras-Zyklus

Daher können Rezeptor-Tyrosinkinasen im Prinzip über die Aktivierung von GNRP oder über die Inhibition eines GAPs zur Aktivierung von Ras beitragen. Aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinasen binden, wie bereits erwähnt, direkt an GAPs - aber nur indirekt an GNRPs. Dennoch ist es meist die indirekte Wechselwirkung mit GNRPs, die zur Bildung von GTP-gebundenem aktiven Ras führt.

Ras-Proteine sowie die Proteine, die die Ras-Aktivität regulieren, wurden während der Evolution stark konserviert. Genetische Untersuchungen in *Drosophila* und *C. elegans* brachten einen ersten Aufschluß darüber, wie Rezeptor-Tyrosinkinasen Ras aktivieren. Von besonderer Bedeutung waren hierbei genetische Studien über die Entwicklung der Photorezeptorzelle im Auge von Drosophila.

Das Facettenauge von Drosophila besteht aus ungefähr 800 identischen Einheiten, die man als **Ommatidien** bezeichnet. Jedes Ommatidium ist aus **8 Photorezeptorzellen** (R1-R8) und 12 akzessorischen Zellen zusammengesetzt. Das Auge entwickelt sich aus einer einfachen Epithelschicht. In einer durch Zell/Zell-Interaktionen festgelegten Reihenfolge werden die zu einem Ommatidium gehörenden Zellen aus der Epithelschicht gelöst. Mit der Entwicklung von **R8** beginnend, bringt jede einzelne sich differenzierende Zelle einen unmittelbaren, noch nicht festgelegten Nachbarn dazu, sein Schicksal anzunehmen und sich in das sich entwickelnde Ommatidium einzulagern.



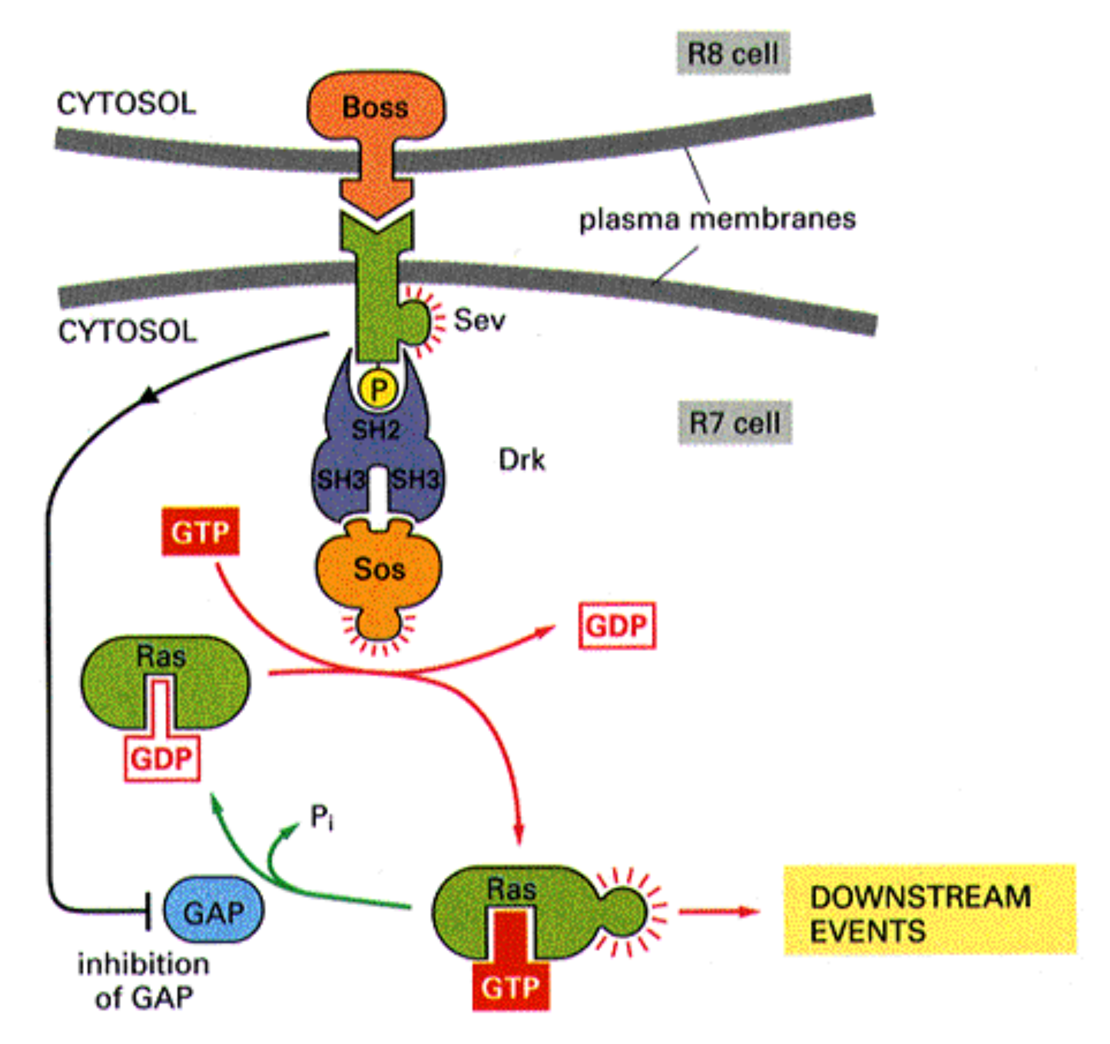
141: Entwicklung des Omatidiums, ausgehend von R8

Die Entwicklung des Photorezeptors **R7**, der für die Wahrnehmung des ultravioletten Lichts benötigt wird, wurde besonders intensiv untersucht. 1976 wurde die mutante Fliege ***sevenless*** (*sev*) beschrieben, in der als einziger Defekt die **fehlende Entwicklung von R7** boobachtet wurde. Man kann solche Mutanten aufgrund ihrer UV-Blindheit recht

einfach selektionieren. Das schließlich isolierte *sev*-Gen kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die von R7-Vorläuferzellen ausgeprägt wird. Weitere genetische Untersuchungen an anderen Mutanten, in denen ebenfalls die Entwicklung von R7 gestört, das Sev-Protein jedoch nicht betroffen ist, führten zur Identifizierung des Gens ***bride-of-sevenless*** (*boss*), das den Liganden des Sev-Rezeptorproteins kodiert. Boss ist ein Transmembrauprotein, das die Membran siebenfach durchspannt und ausschließlich auf der Oberfläche der benachbarten R8-Zelle ausgeprägt wird. Wenn Boss an Sev bindet und aktiviert, so **differenziert** sich die R7-Vorläuferzelle zu einer R7-Photorezeptorzelle aus.

Die einzelnen Komponenten des **intrazellulären Signaltransduktionsweges**, der in R7-Vorläuferzellen über Sev aktiviert wird, waren sehr schwer zu identifizieren. Verschiedene genetische Strategien führten letztendlich zur Identifizierung einiger Gene, die für intrazelluläre Signalproteine kodieren. Eines davon kodiert für ein Ras-Protein. Fliegen mit 2 defekten Kopien des *ras*-Gens sind nicht überlebensfähig. Wenn jedoch nur eine Kopie inaktiviert ist, können die Fliegen überleben, entwickeln aber keine R7-Photorezeptorzellen. Wenn dagegen eine Kopie eines *ras*-Gens überaktiv ist, entwickelt sich R7 sogar in solchen Mutanten, in denen sowohl *sev* als auch *boss* inaktiv sind. Offensichtlich ist die Aktivierung von Ras sowohl notwendig als auch hinreichend, um die Differenzierung von R7 in Gang zu setzen.

Ein zweites Gen, ***son-of-sevenless*** (*sos*), kodiert für ein Guaninnucleotid-lösendes Protein (GNRP), das von der Sev-Rezeptor-Tyrosinkinase benötigt wird, um Ras zu aktivieren. Ein drittes Gen kodiert für **Drk** (für *downstream of receptor kinases*). Drk verbindet den Sev-Rezeptor mit dem Sos-Protein; die **SH2-Domäne** von Drk bindet die aktivierte Tyrosinkinase-Domäne des Sev-Rezeptors, während die beiden SH3-Domänen mit dem Sos-Protein wechselwirken. Ein viertes Gen kodiert für ein **GTPase-aktivierendes Protein** (GAP). Wird dieses Gen inaktiviert, entwickelt sich R7 auch dann, wenn *sev* ausgeschaltet wurde. Wahrscheinlich ist Ras überaktiv, wenn es nicht durch GAP inhibiert wird.



142: Die Signalkaskade über Sevenless löst die R7-Zelldifferenzierung aus

Aktiviert, leitet Ras das Signal weiter, indem es eine Serin/Threonin-Phosphorylierungskaskade in Gang setzt. Diese Kaskade ist in allen Zellen eukaryontischer Organismen, von der Hefe bis zum Menschen, hochkonserviert. Eine entscheidende Komponente dieser Kaskade ist die **MAP-Kinase**.

Tyrosinphosphorylierungen und die anschließende Aktivierung von Ras durch Adapterproteine sind nur von kurzer Dauer. Um diese kurzlebigen Ereignisse in länger andauernde Signale zu verwandeln, muß ein ständiges Signal an den Kern weitergeleitet werden.

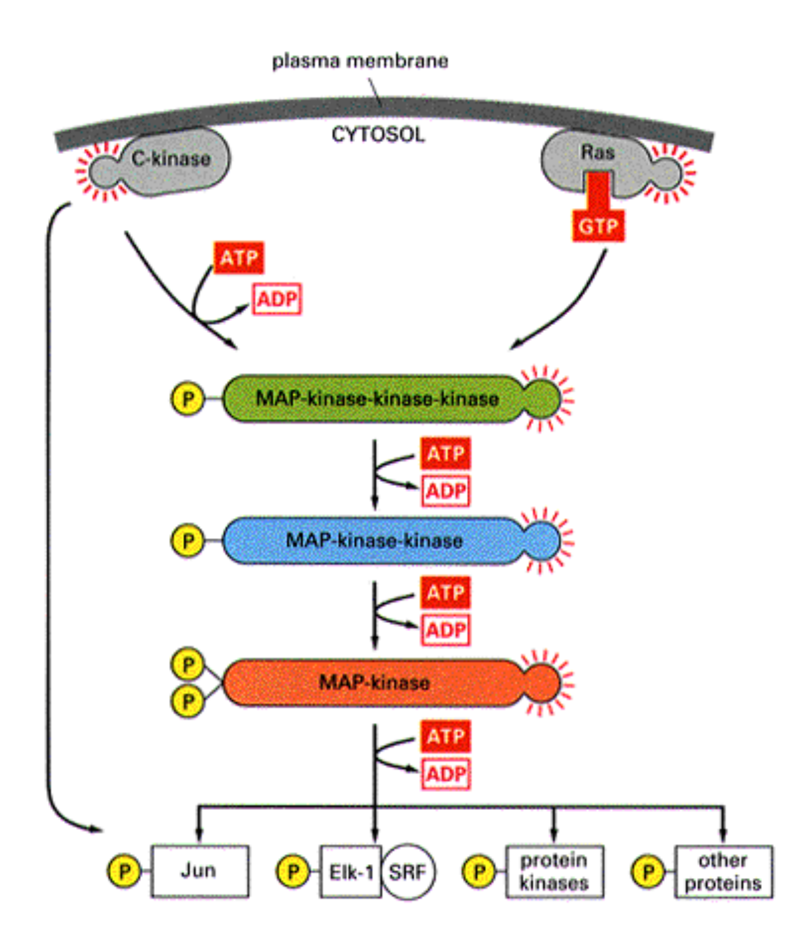
Ein solches Übertragungssystem umfaßt mehrfach ineinandergreifende **Kaskaden von Serin/Threonin-Phosphorylierungen**, die viel lang-

lebiger sind, als die ursprünglichen Tyrosin-Phosphorylierungen, die an solchen Signalübertragungssystemen mitwirken. Viele Serin/ Threonin-Kinasen sind an diesen Kaskadenreaktionen beteiligt, aber eine Familie, die mindestens fünf Mitglieder hat, scheint eine besonders wichtige Rolle zu übernehmen: die **mitogenaktivierte Protein**-(**MAP**)-**Kinasen** (auch als extrazellulär regulierte Kinasen (ERKs) bezeichnet). Diese Kinasen werden durch ein breites Spektrum unterschiedlicher extrazellulärer Wachstums- und Differenzierungs-Signale eingeschaltet, von denen einige Rezeptor-Tyrosinkinasen, andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren.

Ungewöhnlich ist, daß MAP-Kinasen, um ihre volle Aktivität zu erlangen, an einem **Threonin- und** an einem **Tyrosin-Rest** phosphoryliert sein müssen. Diese Reste sind im Protein durch eine einzige Aminosäure getrennt. Die Proteinkinase, die beide Phosphorylierungen katalysiert, ist die **MAP-Kinase-Kinase**. Dadurch, daß für die Aktivierung der MAP-Kinase die Phosphorylierung beider Reste benötigt wird, ist auch gewährleistet, daß sie nur nach einem spezifischen Einsatz der MAP-Kinase-Kinase, deren einziges bekanntes Substrat die MAP-Kinase ist, aktiviert wird. Die MAP-Kinase-Kinase wird selbst über die Phosphorylierung von Serin/ThreoninResten aktiviert, eine Reaktion, die durch die **MAP-Kinase-Kinase-Kinase** katalysiert wird, von der man annimmt, daß sie durch Bindung an aktiviertes **Raf** stimuliert wird.

Ist eine MAP-Kinase aktiviert, leitet sie das Signal weiter, indem sie in der Zelle verschiedenartige Proteine wie andere Proteinkinasen und genregulatorische Proteine phosphoryliert. Oft setzt innerhalb von Minuten nach der Stimulation einer Zelle durch Wachstumsfaktoren die Transkription bestimmter Gene, der sogenannenten "*immediate early-genes*", ein (siehe auch Abb. 134 auf Seite 181).

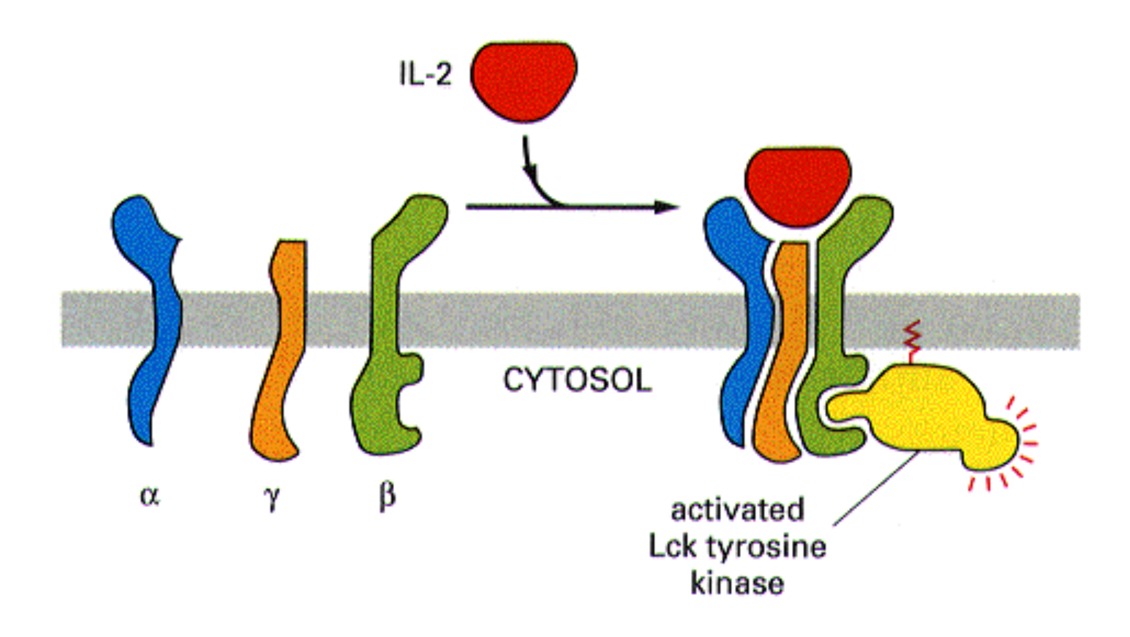
Einmal aktiviert, wandert die MAP-Kinase aus dem Cytosol in den Kern und aktiviert Transkriptionsfaktoren, die schließlich zur Transkription des ***fos*-Gens** führen. Zusätzlich können die MAP-Kinasen das **Jun-Protein** phosphorylieren, das zusammen mit dem neugebildeten Fos-Protein das genregulatorische **AP-1** Protein bildet.



143: PKC oder Ras aktivieren eine Kaskade an Ser/Thr Kinasen

Bemerkung: Viele der isolierten und charakterisierten Oberflächenrezeptoren gehören zu keiner der Hauptgruppen von Rezeptoren, die wir bisher besprochen haben; sie sind weder mit Ionenkanälen verbunden, noch an G-Proteine gekoppelt und besitzen offensichtlich auch keine katalytische Domäne. Zu dieser großen und heterogenen Gruppe gehören die Rezeptoren für die meisten lokalen Mediatoren (als Cytokine bezeichnet), die im haematopoietischen System Zellwachstum und Differenzierung regulieren. Dazu gehören auch einige Hormonrezeptoren (z.B. für das Wachstumshormon und für das Prolaktin) sowie die Antigen-spezifischen Rezeptoren auf T- und B-Lymphozyten. Viele Rezeptoren aus dieser Gruppe arbeiten über assoziierte Tyrosinkinasen, die verschiedene Zielproteine phosphorylieren, wenn der Rezeptor seinen Liganden bindet. Die Kinasen der Tyrosinkinasen-assoziierten Rezeptoren gehören meist zur bekannten **Src-Familie** von Nicht-Rezeptor-Proteinkinasen, oder aber zur erst kürzlich entdeckten Janus-

Familie der Nicht-Rezeptor-Proteinkinasen. Man nimmt an, daß diese Rezeptoren fast genauso arbeiten wie Rezeptor-Tyrosinkinasen, nur daß die Kinase-Domäne von einem unterschiedlichen Gen kodiert wird und mit der Rezeptor-Polypeptidkette über eine nicht-kovalente Wechselwirkung verbunden ist. Wie bei Rezeptor-Tyrosinkinasen geht die Aktivierung vermutlich oft mit einer Dimerisierung des Rezeptors einher, die durch den Liganden ausgelöst wird.



144: Beispiel aus der Familie der Nicht-Rezeptor-Proteinkinasen: IL-2 R

Es gibt mindestens acht Mitglieder der Src-Familie von Nicht-Rezeptor-Proteintyrosinkinasen: **Src**, **Yes**, **Fgr**, **Fyn**, **Lck**, **Lyn**, **Hck** und **Blk**. Sie enthalten SH2 und SH3-Domänen und befinden sich alle an der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran, wo sie zum Teil durch die Wechselwirkung mit Transmembran-Rezeptorproteinen festgehalten werden, zum Teil über kovalent verknüpfte Lipidseitenketten verankert sind. Die verschiedenen Mitglieder sind mit unterschiedlichen Rezeptoren assoziiert und phosphorylieren eine sich überschneidende, jedoch definierte Menge an Zielproteinen. **Lyn**, **Fyn** und **Lck** sind zum Beispiel in **Lymphozyten** mit unterschiedlichen Rezeptoren assoziiert. Wenn ein extrazellulärer Ligand den entsprechenden Rezeptor bindet, wird - je nach Rezeptor - eine spezifische Auswahl dieser Tyrosinkinasen aktiviert.

Viel weniger ist über die **Janus-Familie** von Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen bekannt, zu der **JAK1**, **JAK2** und **Tyk2** gehören. Sie sind an der Signaltransduktion vieler Tyrosinkinase-gekoppelter Rezeptoren beteiligt; zu diesen zählen die Rezeptoren für das Wachstumshormon, für das Prolaktin und für die verschiedenen Cytokine, die auf haematopoietische Zellen wirken.

Phosphorylierte Tyrosin-Reste können sehr rasch von **Protein-Tyrosinphosphatasen** wieder dephosphoryliert werden. Sie entfernen Phosphatgruppen nur von spezifischen Phosphotyrosinen und ihre hohe spezifische Aktivität gewährleistet, daß Tyrosinphosphorylierungen nicht lange bestehen bleiben, so daß das Ausmaß an Tyrosinphosphorylierung in ruhenden Zellen sehr niedrig ist. Protein-Tyrosinphosphatasen kehren jedoch nicht einfach nur ständig die Wirkung von Protein-Tyrosinkinasen um; sie können dazu reguliert werden, besondere Aufgaben in der Signaltransduktion oder auch in der Kontrolle des Zellzyklus zu übernehmen.

Ein bedeutendes Beispiel einer regulierten Protein-Tyrosinphosphatase ist das **CD45-Protein**, das sich auf der Oberfläche von weißen Blutkörperchen befindet und bei der Aktivierung von T- und B-Lymphozyten durch Fremdantigene eine wichtige Rolle spielt. CD45 ist ein Glykoprotein, das die Membran einmal durchspannt. Seine Tyrosinphosphatase-Domäne ist zur cytosolischen Seite hin orientiert. Wird das Protein an der Zelloberfläche durch Antikörper quervernetzt, so wird die katalytische Domäne in der Zelle dazu aktiviert, Phosphatgruppen von Tyrosin-Resten spezifischer Zellproteine zu entfernen. Ein solches Zielprotein ist wahrscheinlich die **Tyrosinkinase Lck**. Die Dephosphorylierung durch CD45 bewirkt anscheinend, daß Lck andere Proteine in der Zelle phosphoryliert.

Normalerweise teilen sich Zellen höherer Organismen nur dann, wenn sie über Wachstumsfaktoren dazu angeregt werden. Diese werden von anderen Zellen hergestellt und wirken im allgemeinen über ihre Bindung an Rezeptor-Tyrosinkinasen. **Krebszellen** vermehren sich im Übermaß, vor allem deswegen, weil sie aufgrund einer Anhäufung von Mutationen für die Proliferation nicht mehr auf eine Stimulation durch andere Zellen angewiesen sind und daher auch nicht mehr der normalen „sozialen" Kontrolle des Zellwachstums unterliegen.

Es ist nicht überraschend, daß viele dieser Mutationen Gene betreffen, die für Proteine kodieren, die am Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelten Signaltransduktionsweg beteiligt sind. Tatsächlich wurden viele der Gene für die in diesem Kapitel besprochenen Signalproteine einschließlich Ras, Src, Raf, Fos und Jun u.v.a. zunächst in mutierter Form in **Krebszellen** oder in **krebsauslösenden Tumorviren** identifiziert. Wie bereits ausgeführt, werden mutierten Gene als **Oncogene** bezeichnet; die normalen Gene bezeichnet man deswegen manchmal als **Proto-Oncogene**.

Im Prinzip könnte man erwarten, daß **jede Mutation**, die zur Synthese eines hyperaktiven Proteins führt, das irgendwo im Signalübertragungsweg eines Wachstumsfaktors zum Zellkern wirkt, auch zu Krebs führt, da das hyperaktive Protein die Zelle unabhängig von der Anwesenheit des entsprechenden Wachstumsfaktors zum Wachstum anregt. Diese Annahme wird durch eine Reihe von Hinweisen gestützt:

Das ***sis*-Oncogen**, beispielsweise, kodiert für eine funktionell aktive Form von PDGF, die in unangemessener Weise ausgeprägt wird; Zellen, die das sis-Oncogen besitzen und gleichzeitig den PDGF-Rezeptor ausprägen, regen sich selbst ständig zum Wachstum an (autokriner Regelkreis).

Das ***erbB*-Oncogen** kodiert für eine verkürzte Form des EGF-Rezeptors mit einer ständig aktiven intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne; Zellen, die dieses Oncogen ausprägen, verhalten sich so, als würden sie ständig über einen Wachstumsfaktor zur Teilung angeregt.

Eine ähnliche Auswirkung zeigt die Infektion von Zellen durch ein Virus, das das für eine aktivierte Form der Src-Tyrosinkinase kodierende ***v-src*-Oncogen** trägt.

Ein weiteres Beispiel ist das ***ras*-Oncogen**, dessen abnormales Genprodukt nicht inaktiviert werden kann, da das veränderte Ras-Protein kein GTP mehr hydrolysieren kann. Zellen teilen sich auch dann abnormal, wenn sie ein Oncogen ausprägen, das für eine ständig aktive Form eines genregulatorischen Proteins wie Jun oder Fos kodiert, welche normalerweise über Wachstumsfaktoren aktiviert werden.

Die Untersuchung solcher Oncogene hat nicht nur zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Krebsentstehung beigetragen, sondern auch zur Entdeckung vieler bis dahin unbekannter Proteine aus dem Signalübertragungsweg der Wachstumsfaktoren geführt.

Die Zelle als Grundbaustein für verschiedene Gewebe

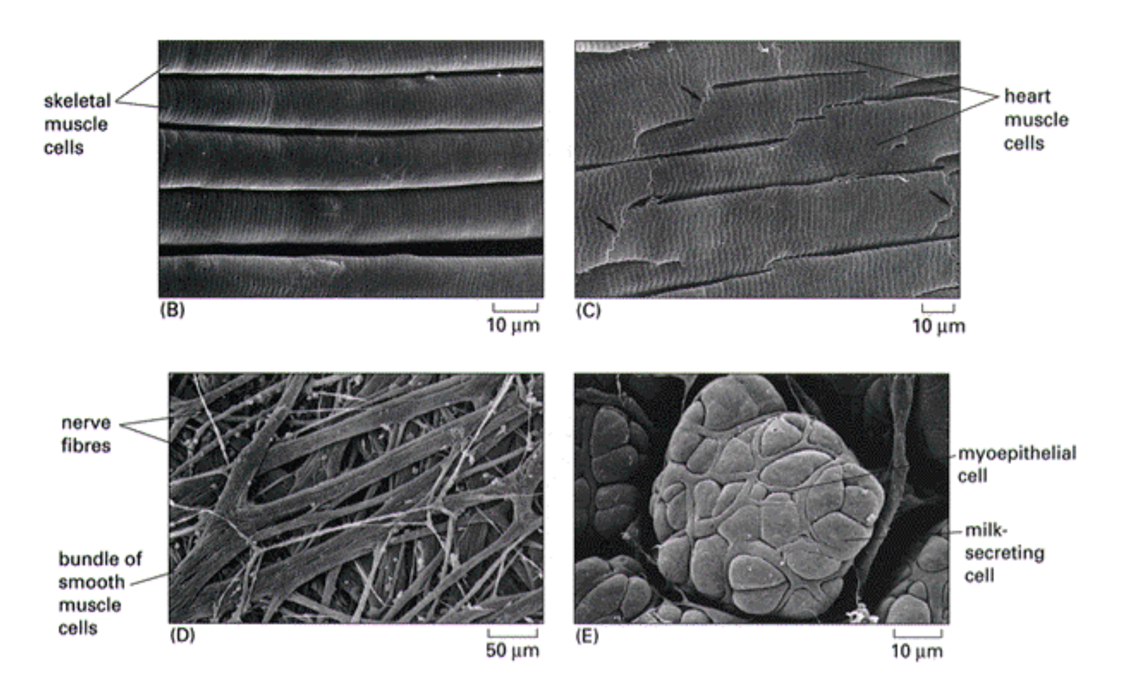
- *Aufbau am Beispiel…*

DER MUSKULATUR

Muskelzellen sind im Vergleich zu anderen, typischeren Tierzellen hochspezialisiert. Insbesondere die Actin- und Myosin-haltigen kontraktilen Elemente der Muskelzellen, auch Myofibrillen genannt, sind nicht so labil wie die Actin- und Myosin-Strukturen nichtmuskulärer Zellen. Die Muskelkontraktion ist die am besten bekannte Art der **Fortbewegung**: Laufen, Gehen, Schwimmen und Fliegen von Wirbeltieren beruht auf der Fähigkeit der **gestreiften Skelettmuskulatur**, sich an ihrem Knochengerüst schnell zusammenzuziehen, und unwillkürliche Bewegungen, wie das Pumpen des **Herzens** und die **Darmperistaltik** entstehen durch die Kontraktion des Herzmuskels beziehungsweise der **glatten Muskulatur**.

Wie enstehen solche komplexen Gewebe? Dazu soll zunächst die Entstehung von Muskelzellen abgehandelt werden.

Der Begriff „Muskel" umfaßt eine Vielzahl von Zelltypen, die alle auf Kontraktion spezialisiert, in vieler Hinsicht aber unterschiedlich sind. Kontraktile Systeme aus Actin und Myosin sind das grundlegende Merkmal aller tierischen Zellen, jedoch haben Muskelzellen diesen Apparat in hohem Maße weiterentwickelt. Säuger besitzen vier Hauptkategorien von Zellen, die auf Kontraktion spezialisiert sind: **Skelettmuskelzellen**, **Herzmuskelzellen**, **glatte Muskelzellen** und **Mycepithelzellen**. Diese unterscheiden sich in Funktion, Aufbau und Entwicklung. Obwohl sie alle ihre Kontraktionskraft mit Hilfe von organisierten, auf Actin und Myosin basierenden Filamentsystemen zu erzeugen scheinen, unterscheiden sich die eingesetzten Actin- und Myosin-Moleküle etwas in ihrer Aminosäure-Sequenz, sind in der Zelle anders angeordnet und mit verschiedenen Sätzen von Proteinen assoziiert, die die Kontraktion kontrollieren.



145: REM Aufnahmen: Morphologie der 4 verschiedenen kontraktilen Zelltypen

Skelettmuskelzellen sind praktisch für alle willkürlich kontrollierten Bewegungen verantwortlich. Diese Zellen können beim erwachsenen Menschen 2 bis 3 cm lang sein und einen Durchmesser von l00 mm haben. Sie werden häufig wegen ihrer sehr langgezogenen Form als **Muskelfasern** bezeichnet. Jede von ihnen ist ein **Syncytium** mit vielen Kernen in einem gemeinsamen Cytoplasma.

Die anderen Typen von Muskelzellen sind mehr von klassischer Art, da sie nur einen Zellkern besitzen. **Herzmuskelzellen** ähneln den Skelettmuskelzellen darin, daß ihre Actin- und Myosin-Filamente in sehr geordneten Reihen vorliegen und eine Folge kontraktiler Einheiten oder Sarcomere bilden, was den Zellen ein gestreiftes Aussehen verleiht. **Glatte Muskelzellen** werden so genannt, weil sie im Gegensatz dazu nicht gestreift sind. Die Aufgaben der glatten Muskeln sind vielfältig, sie reichen vom Vorantreiben der Nahrung im Verdauungstrakt bis zum Aufrichten der Haare als Reaktion auf Kälte oder Angst.

Myoepithelzellen haben ebenfalls keine Streifung, aber abweichend von allen anderen Muskelzellen liegen sie in Epithelien und stammen vom **Ektoderm** ab (siehe unten). Sie bilden den Dilatationsmuskel der **Iris** und dienen zum Ausstoß von Speichel, Schweiß und Milch aus den entsprechenden **Drüsen**.

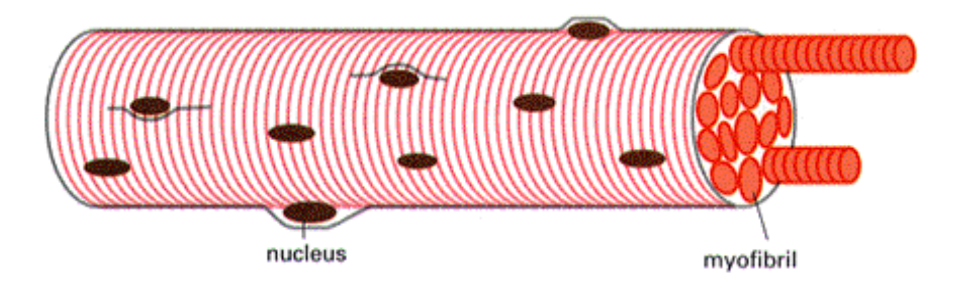
Muskelzellen entstehen während der Embryonal-Entwicklung aus **Myoblasten**, die von den **Somiten** eines Wirbeltier-Embryos in einem sehr frühen Stadium abstammen (**Mesoderm**; siehe Keimblattbildung). Während der Entwicklung werden die Myoblasten **determiniert** und wandern dann in das angrenzende embryonale Bindegewebe oder Mesenchym ein. Um ein Myoblast zu werden, ist die Aktivierung eines oder mehrerer **myogener Gene** notwendig, die Gen-Regulatorproteine der **Helix-Loop-Helix-Familie** kodieren. Nach einer Teilungsphase verschmelzen die Myoblasten miteinander zu den vielkernigen Skelettmuskelzellen. Indem sie fusionieren, machen sie einen drastischen Wechsel ihres Phänotyps durch, was auf der koordinierten Aktivierung einer ganzen Batterie von Muskel-spezifischen Genen beruht. Wenn die Fusion einmal stattgefunden hat, werden die Kerne niemals wieder ihre DNA replizieren. An der Verschmelzung sind auch spezifische **Zell/Zell-Adhäsionsmoleküle** beteiligt, die die Erkennung zwischen Myoblasten vermitteln.

Skelettmuskelzellen bleiben während der gesamten Lebensdauer des Säugers erhalten. Während dieser Zeit modulieren sie ihre Eigenschaften entsprechend den funktionellen Erfordernissen. Das Genom enthält eine Vielzahl **verschiedener Kopien der Gene**, die viele charakteristische Proteine der Skelettmuskelzelle kodieren; und die RNA-Transkripte vieler dieser Gene können **auf mehrere Arten gespleißt** werden. Das Ergebnis ist eine Fülle von **Proteinvarianten** für die Bestandteile des kontraktilen Apparats. Während die Muskelzelle reift, wird - angepaßt an die wechselnden Anforderungen an Geschwindigkeit, Kraft und Ausdauer - eine unterschiedliche Auswahl an Proteinvarianten produziert. Innerhalb eines einzigen ausgewachsenen Muskels können deshalb nebeneinander verschiedene Typen von Skelettmuskelzellen gefunden werden, jede mit einer anderen Gruppe von Proteinvarianten und anderen funktionellen Eigenschaften.

In Erwachsenen überdauern einige **Myoblasten** als kleine, abgeflachte inaktive Zellen, in engem Kontakt mit der reifen Muskelzelle und eingebettet in deren Basallamina-Hülle. Wird ein Muskel beschädigt oder künstlich mit **FGF** behandelt, werden diese sogenannten **Satellitenzellen** zur Teilung aktiviert; ihre Nachkommen können zur Bildung neuer Muskelzellen verschmelzen. Satellitenzellen sind also die **Stammzellen** des adulten Skelettmuskels, die normalerweise als Reserve im Ruhezustand gehalten werden, aber bei Bedarf als eine sich selbst erneuernde Quelle endgültig differenzierter Zellen zur Verfügung stehen.

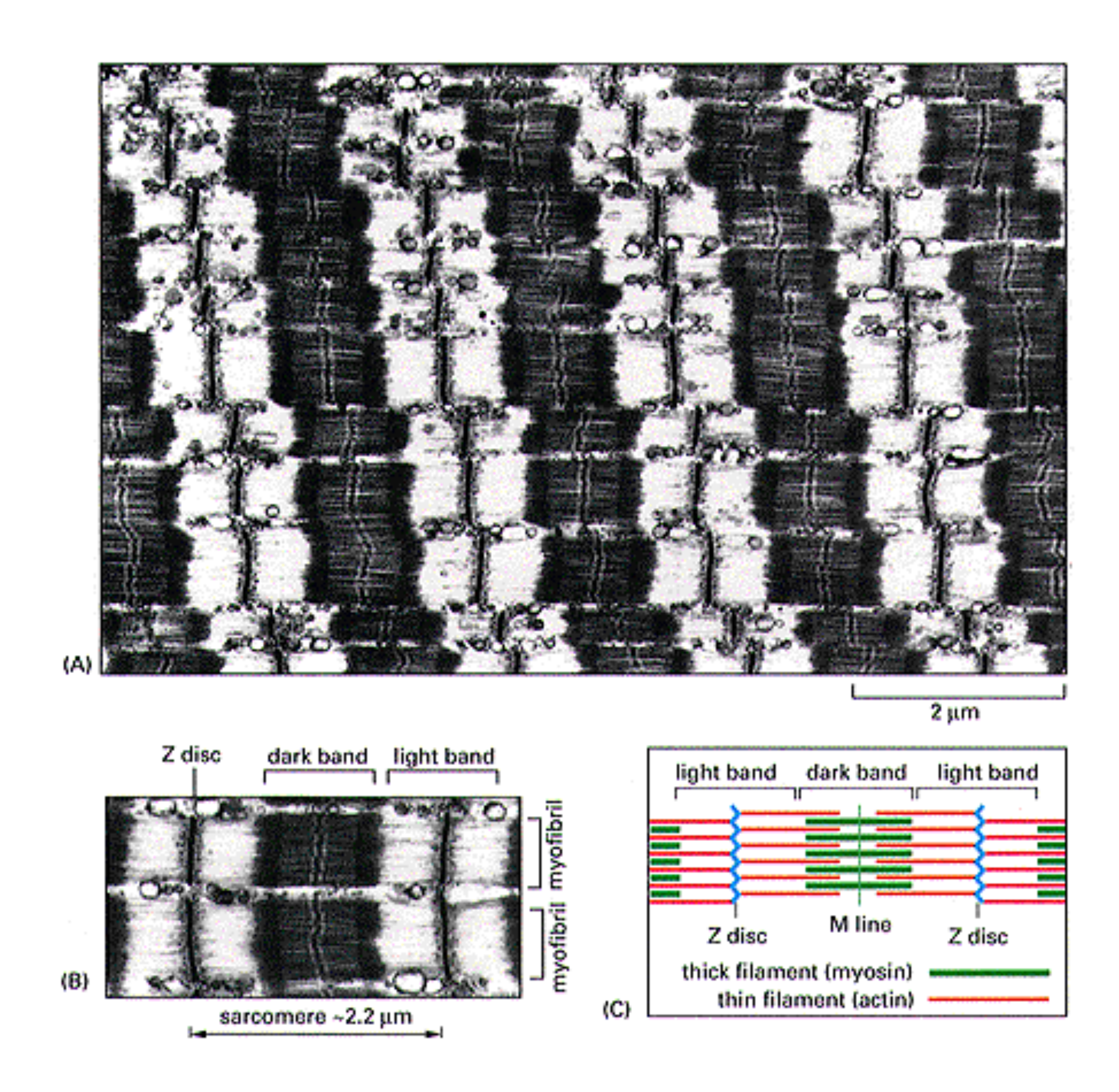
Obwohl dieser Reparaturmechanismus für Muskeln in kleinen Tieren, wie z.B. Mäusen, gut funktioniert, ist er im Menschen weniger wirkungsvoll. Bei der **Muskeldystrophie** beispielsweise sterben differenzierte Skelettmuskelzellen aufgrund eines genetischen Defekts im Cytoskelett-Protein Dystrophin. Die Folge ist eine Vermehrung der Satellitenzellen, um neue Muskelzellen zu bilden; diese Regenerationsreaktion kann aber mit der Schädigung nicht Schritt halten, so daß schließlich Muskelzellen durch **Bindegewebe** verdrängt werden, was jede weitere Möglichkeit zur Regeneration verhindert.

Die langen, dünnen **Muskelfasern** der Skelettmuskulatur sind riesige Einzelzellen, die sich in der Entwicklung durch **Verschmelzung vieler getrennter Zellen** bilden. Die Kerne der beteiligten Zellen bleiben in der großen Zelle erhalten und liegen dort unmittelbar unter der Plasmamembran. Der Hauptteil des Cytoplasmas jedoch, etwa zwei Drittel seiner Trockenmasse, besteht aus **Myofibrillen**, den kontraktilen Elementen der Muskelzellen. Sie sind zylinderförmige Gebilde mit einem Durchmesser von 1 bis 2 μm, die oft ebenso lang werden wie der gesamte Muskel.



146: Eine Muskelfaser besteht aus einzelnen Myofibrillen

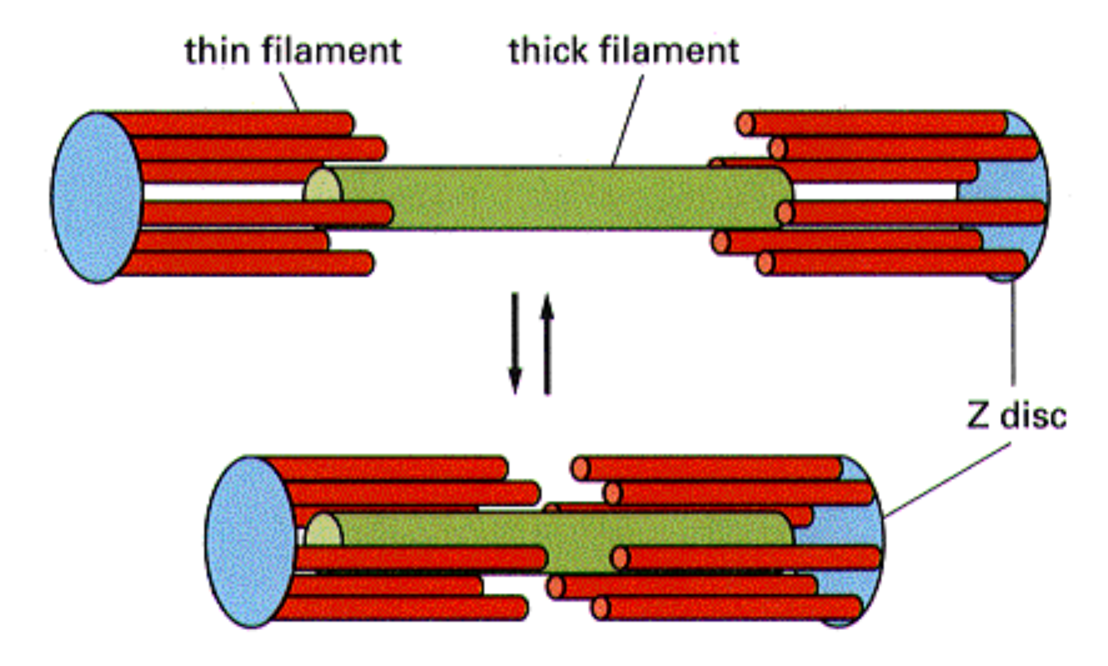
Jede Myofibrille besteht aus einer Kette winziger kontraktiler Einheiten oder **Sarkomeren**, die jeweils etwa 2,2 μm lang sind und den Myofibrillen der Wirbeltiere ein quergestreiftes Aussehen verleihen. In jedem Sarkomer findet man eine Reihe heller und dunkler Streifen; eine dunkle Linie in der Mitte der hellen Streifen (Z-Scheibe), die einzelne Sarkomere voneinander trennt.



147: Die Myofibrillen-Grundeinheit ist das Sarkomer

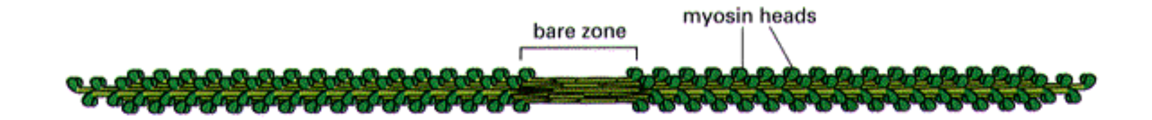
Jedes Sarkomer stellt eine kleine, genau geordnete Ansammlung paralleler, teilweise ineinandergreifender Filamente dar. Die dünnen Filamente aus **Actin und assoziierten Proteinen** sind an den beiden Enden des Sarkomers, den Z-Scheiben, befestigt. Sie laufen bis zur Mitte des Sarkomers und überlappen sich dort mit den dicken Filamenten, den Muskel-spezifischen Isoformen von Myosin-II.

Die Verkürzung der Sarkomere entsteht, weil die Myosin-Filamente an den Actin-Filamenten vorbeigleiten, ohne daß sich die Länge der Filamente selbst verändert. Dieses Gleitfaser-Modell, das 1954 erstmals vorgeschlagen wurde, war von zentraler Bedeutung für das Verständnis des Kontraktionsmechanismus.



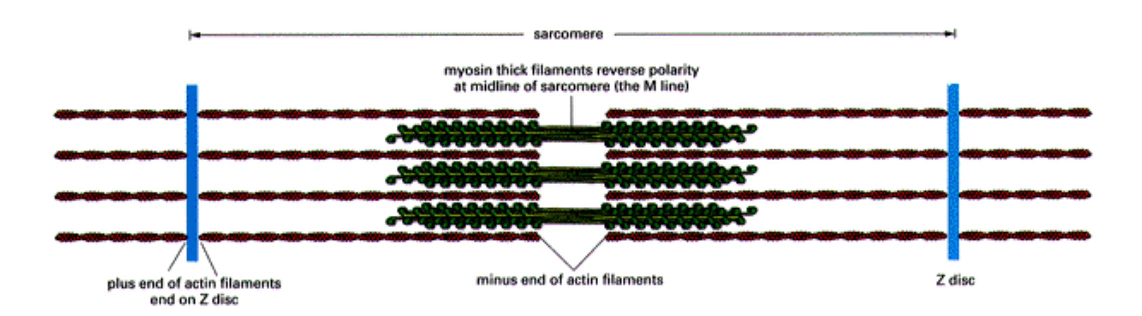
148: Das Gleitfaser-Modell der Muskelkontraktion: Actin und Myosin-II

Die ultrastrukturelle Grundlage der krafterzeugenden Wechselwirkungen beruht auf das Zusammenwirken vieler Myosin-Filamenten, die - etwas versetzt - eine Struktur, die zahlreiche winzige Querbrücken besitzt. Diese Querbrücken sind **Köpfe von Myosin-II**, und wenn der Muskel sich zusammenzieht, interagieren Myosin- und Actin-Filamente miteinander. Der globuläre Kopf des Myosins stellt die bereits besprochene **Motor-Domäne** des Myosin-II-Moleküls dar (Seite 123), und hat zwei Funktionen: sie bindet Actin und hydrolysiert ATP.



149: Eine Myosin-Filament besteht aus lauter einzelnen Myosin-Molekülen

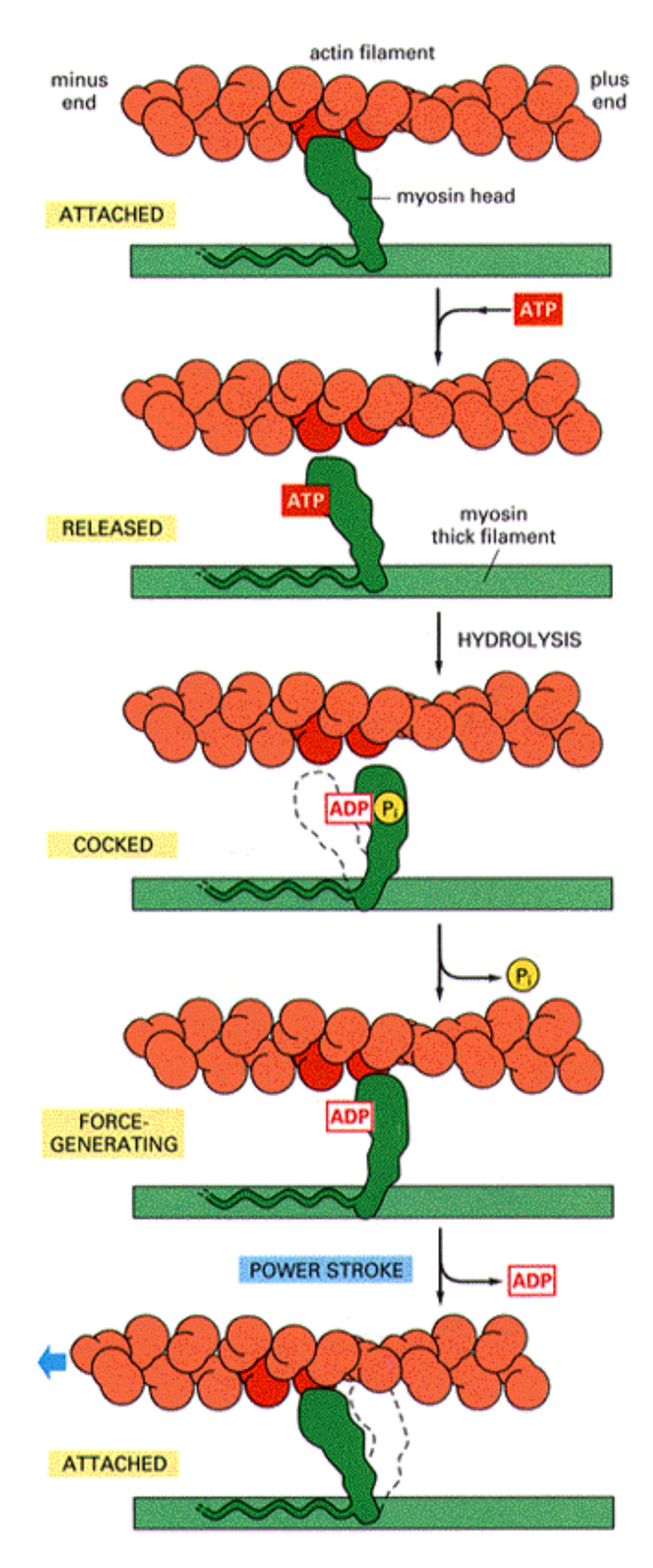
Die Myosin-Köpfchen liegen innerhalb der Myosinfibrille in entgegengesetzter Orientierung, beiderseits des nackten Mittelbereichs. Da die Köpfchen mit den Actin-Filamenten in Wechselwirkung treten müssen, besitzen die Actin-Filamente auf den beiden Seiten eines Sarkomers **entgegengesetzte Polarität**.



150: Actin und Myosin-Filamente besitzen entgegengesetzte Polarität

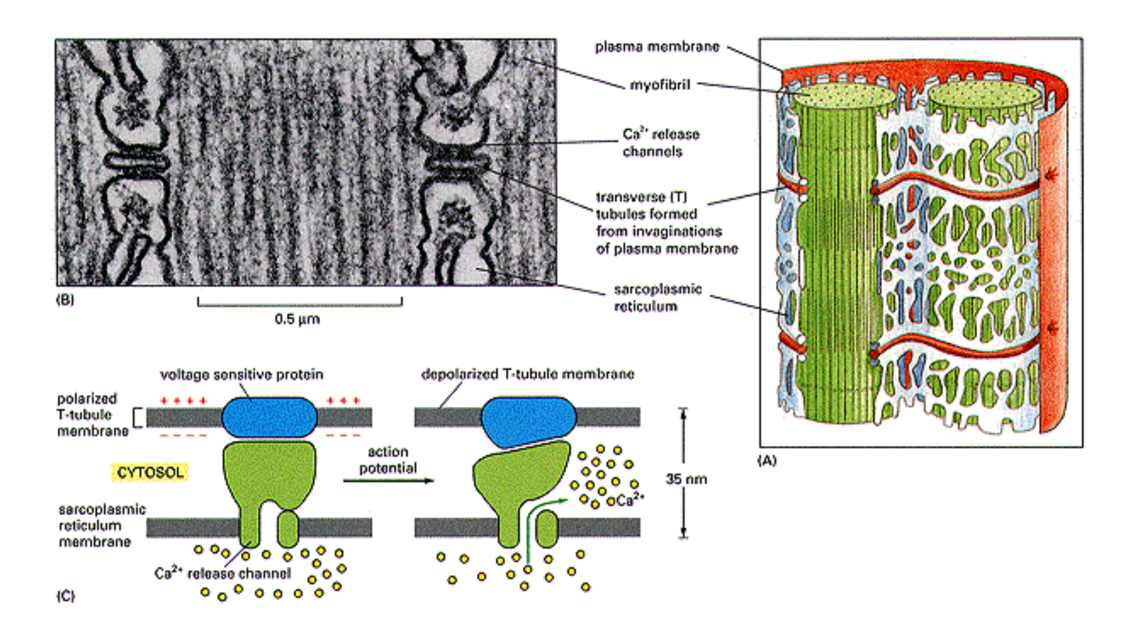
Die Muskelkontraktion wird durch die **Wechselwirkungen** zwischen den **Myosin-II Köpfchen** und den benachbarten **Actin-Filamenten** angetrieben, wobei ATP hydrolysiert wird. Die Hydrolyse des ATP's und die anschließende Dissoziation der Reaktionsprodukte (ADP und Pi) erzeugen eine geordnete Folge allosterischer **Veränderungen in der Konformation des Myosin**s, mit der Folge, daß ein Teil der freiwerdenden Energie in **Bewegung** umgesetzt wird.

Jedes einzelne Myosin-Köpfchen „wandert" also in einer Richtung am Actin-Filament entlang, und zwar immer in Richtung des plus-Endes. Während das Myosin-Köpfchen die zyklische Konformationsänderung durchmacht, zieht es gegen das Actin-Filament, so daß die beiden Filamente aus Actin und Myosin aneinander vorbeigleiten. Wenn sich ein einzelnes Myosin vom Actin-Filament gelöst hat, wird es von den anderen Myosin-Köpfchens desselben Filament weitergetragen. Jedes Myosin Filament besitzt etwa 300 Köpfchen, und bei einer schnellen Kontraktion durchläuft jedes Köpfchen etwa fünfmal in der Sekunde den Bewegungszyklus. Auf diese Weise können Actin- und Myosin-Filamente mit bis zu 15 μm je Sekunde aneinander entlanggleiten.



151: Modell der entgegengesetzten Bewegung von Actin und Myosin-Filamenten

Die gerade beschriebene krafterzeugende Wechselwirkung findet nur dann statt, wenn ein Signal von dem zugehörigen motorischen Nerv zum Skelettmuskel gelangt. Der Nervenimpuls löst an der Plasmamembran der Muskelzelle ein Aktionspotential aus, und diese elektrische Erregung breitet sich rasch in eine Reihe von Membranfalten aus. Diese **Transversal- oder T-Tubuli** erstrecken sich von der Plasmamembran nach innen um jede Myofibrille. Von dort wird das Signal über einen kleinen Spalt auf das **Sarkoplasmatische Reticulum** (**SR**) übertragen, eine angrenzende Hülle verästelter, abgeflachter Vesikel, die jede Myofibrille wie ein Netzstrumpf umgeben.

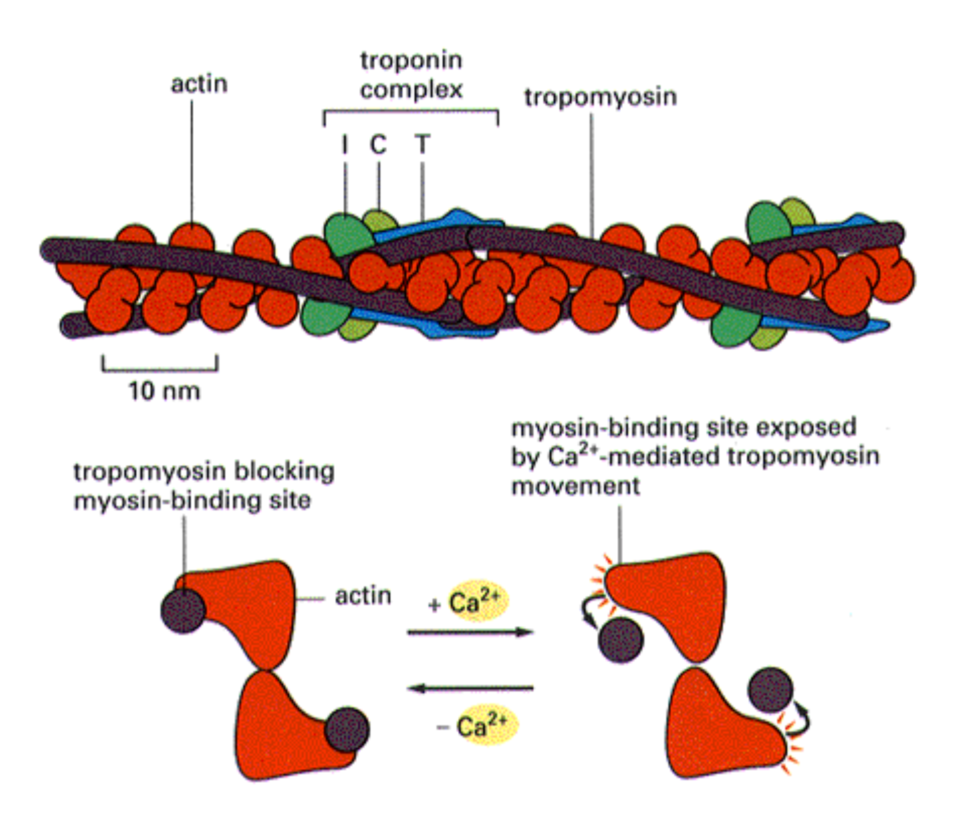


152: T-Tubuli und SR: Durch Ca^{2+}-Einstrom wird Muskelbewegung erzeugt

In dem Verbindungsbereich erstrecken sich große Ca^{2+}-Freigabekanäle wie Pfeiler von der Membran des SR bis zur Membran des T-Tubulus auf der anderen Seite, mit der sie in Kontakt treten. Wenn die spannungsempfindlichen Proteine in der Membran des T-Tubulus durch das ankommende Aktionspotential aktiviert werden, sorgen sie für das Öffnen einiger Ca^{2+}-Freigabekanäle. Ca^{2+}-Ionen gelangen aus dem SR in den Spalt der Verbindung; dort sorgen sie dafür, daß sich weitere Ca^{2+}-Kanäle öffnen, so daß sich die Reaktion verstärkt. Die Ca^{2+}-Ionen, die ins Cytosol strömen, setzen dann die Kontraktion der einzelnen Myofibrillen in Gang.

Da das Signal von der Plasmamembran der Muskelzelle innerhalb weniger Millisekunden über T-Tubuli und Sarkoplasmatisches Reticulum zu jedem Sarkomer der Zelle weitergeleitet wird, ziehen sich alle Myofibrillen in der Zelle gleichzeitig zusammen. Der Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration im Cytosol ist nur vorübergehend, denn das Ca^{2+} wird schnell wieder durch eine **Ca^{2+}-ATPase** ins SR zurückgepumpt (siehe Seite 56, 175, 183). Im typischen Fall hat die Ca^{2+}-Konzentration im Cytosol **nach 30 Millisekunden wieder den Ruhewert** erreicht, so daß die Myofibrillen sich entspannen.

Die Ca^{2+}-Abhängigkeit der Skelettmuskel-Kontraktion bei Wirbeltieren und damit ihre Abhängigkeit von motorischen Impulsen, die von Nerven weitergeleitet werden, ist voll und ganz auf eine Gruppe spezialisierter Zubehör-Proteine zurückzuführen, die eng mit den Actin-Filamenten assoziiert sind. Eines dieser Zubehör-Proteine ist eine muskelspezifische Form des **Tropomyosins**, jenes stäbchenförmigen Moleküls, das bereits beschrieben wurde (Seite 128ff) und in der Furche einer Actin-Helix bindet.



153: Tropomyosin bindet an Actin und blockiert in Abwesenheit von Ca^{2+} die Bindung von Myosin- an Actin-Filamente

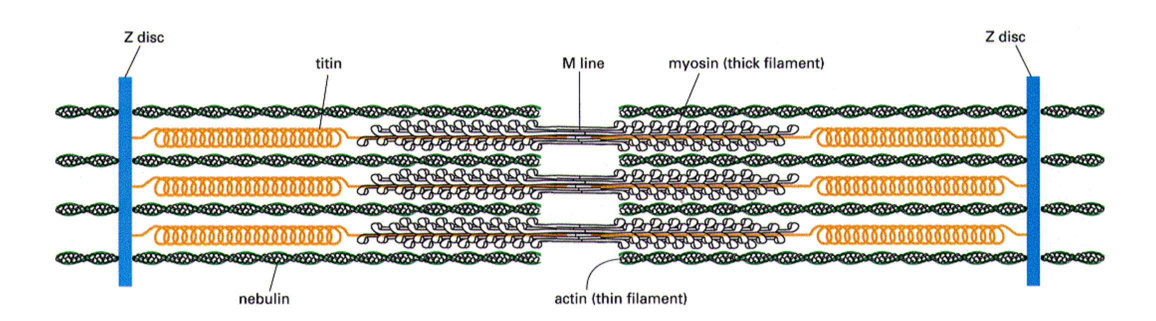
Das zweite wichtige Zusatz-Protein, das in den Skelettmuskeln der Wirbeltiere an der Ca^{2+}-Regulation mitwirkt, ist das **Troponin**. Troponin besteht aus drei Polypeptiden mit den Bezeichnungen **Troponin T, I und C** (für Tropomyosin-bindend, inhibierend und Calcium-bindend). Der Troponin-Komplex ist länglich geformt, wobei die Untereinheiten C und I einen globulären Kopf und T einen langen Schwanz bilden. Der Schwanz des Troponin T bindet an Tropomyosin und ist vermutlich dafür zuständig, Tropomyosin am dünnen Actin-Filament in die richtige Position zu bringen. Troponin C bindet bis zu **vier Ca^{2+}-Ionen** und hebt als Ca^{2+}-Komplex die Hemmung der Myosin-Bindung an Actin auf.

Die bemerkenswerte Geschwindigkeit und Kraft der Muskelkontraktion sind nur möglich, weil die Actin- und Myosin-Filamente in den einzelnen Myofibrillen in **optimaler Entfernung** voneinander und in der richtigen Anordnung gehalten werden. Mehr als ein **Dutzend Proteine** tragen zum genauen Aufbau der Myofibrille bei: die Reihenfolge ihrer Zusammenlagerung und die Steuerung dieses Vorgangs sind derzeit wichtige Forschungsthemen.

Die Actin-Filamente sind mit dem plus-Ende an der Z-Scheibe verankert, wo sie von anderen Proteinen in einer quadratisch-gitterförmigen Anordnung festgehalten werden. Eines der wichtigsten Strukturproteine in diesem Bereich ist das **α-Actinin**, ein Protein, das Actin quervernetzt und bereits beschrieben wurde (Seite 121ff); es kommt in großer Menge vor und konzentriert sich besonders in den Z-Scheiben der Myofibrillen.

Daneben enthalten Skelettmuskeln zwei besonders große Proteine namens **Titin** und **Nebulin**, die mit den Actin- und Myosin-Filamenten ein Fasergeflecht bilden. Titin ist mit einer molaren Masse von 3×10^6 das größte bisher bekannte Polypeptid. Die seilartigen Titin-Moleküle erstrecken sich von den dicken Filamenten zur Z-Scheibe und wirken vermutlich wie Federn, welche die dicken Myosin-Filamente in der Mitte des Sarkomers festhalten. Nebulin dagegen, ebenfalls ein großes Molekül, ist eng mit den dünnen Actin-Filamenten assoziiert und besteht fast auf seiner ganzen Länge aus vielen Wiederholungen eines Actin-bindenden Motivs aus 35 Aminosäuren. Die Zahl dieser Motive

und damit die Länge des Nebulin-Moleküls ist so groß, daß das Molekül sich von einem Ende des Actin-Filaments zum anderen erstreckt. Nebulin dürfte also als „molekulares Maßband" dienen, das möglicherweise den Zusammenbau des Actins und die Länge der Actin-Filamente während der Muskelentwicklung steuert.



154: Titin und Nebulin gewähren aufgrund ihrer hochmolekularen Struktur die Elastizität einzelner Sarkomere in den Muskelzellen

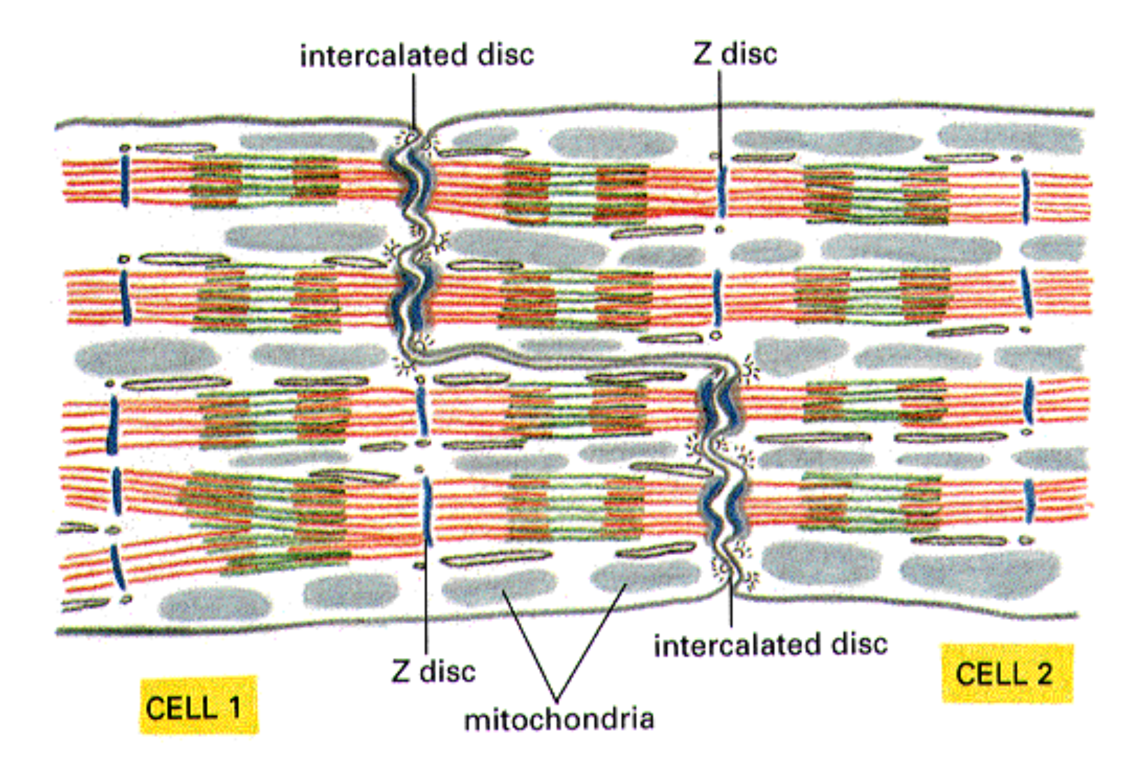
Die nebeneinanderliegenden Myofibrillen sind durch ein System aus Desmin-Intermediärfilamenten gekoppelt, und die ganze Anordnung ist über verschiedene Proteine an der Plasmamembran der Muskelzelle verankert. Eines dieser Proteine ist das **Dystrophin**, das bei Patienten mit Muskelschwund entweder defekt ist oder ganz fehlt. Dystrophin ähnelt in seiner Struktur stark dem **Spectrin** und dürfte spezifische Proteine der Muskelzellmembran mit den Actin-Filamenten in der Myofibrille verbinden.

Die beiden anderen Muskeltypen sind der **Herzmuskel**, der sich im Laufe eines durchschnittlichen Menschenlebens etwa drei Milliarden mal zusammenzieht, und die **glatte Muskulatur**, die für die langsameren, länger andauernden charakteristischen Bewegungen des Darms und anderer innerer Organe sorgt. Alle drei Arten von Muskelzellen ziehen sich durch den selben **Gleitfaser-Mechanismus** aus Actin- und Myosin-II-Filamenten zusammen.

Der Herzmuskel ist wie die Skelettmuskulatur quergestreift, was einen sehr ähnlichen Aufbau aus Actin- und Myosin-Filamenten widerspiegelt. Auch die Kontraktion wird durch einen ähnlichen Mechanismus

ausgelöst: ein Aktionspotential veranlaßt das Sarkoplasmatische Reticulum zur Ausschüttung von Ca^{2+}, das dann über einen Komplex aus Troponin und Tropomyosin die Kontraktion in Gang setzt.

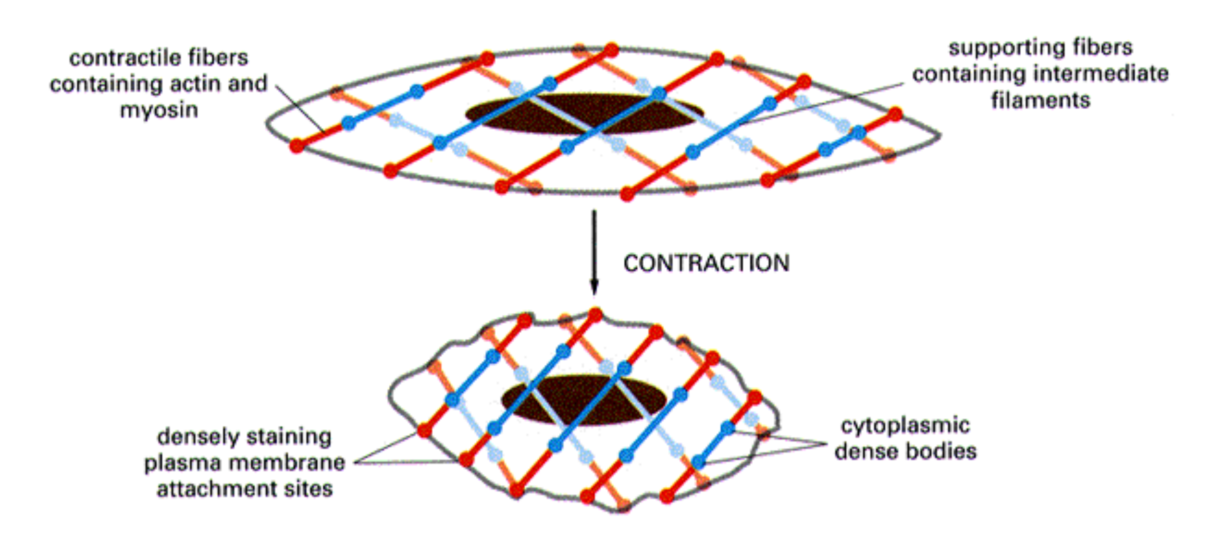
Herzmuskelzellen sind aber keine Syncytien, sondern **Einzelzellen** mit jeweils einem einzigen Zellkern. Sie sind an den Enden durch die sogenannten **Interkalationsscheiben** verbunden. Die Interkalationsscheiben haben mindestens drei Funktionen: (1) sie heften mit Hilfe von Desmosomen eine Zelle an die nächste; (2) sie verbinden die Actin-Filamente in den Myofibrillen benachbarter Zellen und erfüllen damit eine ähnliche Funktion wie die Z-Scheiben im Inneren der Zellen; (3) sie enthalten Gap Junctions, über die sich ein Aktionspotential schnell von einer Zelle zur nächsten ausbreiten kann, und sorgen so für die gleichzeitige Kontraktion der Herzmuskelzellen.



155: Herzmuskelzellen sind durch Interkalationscheiben voneinander getrennt

Die „primitivste" Muskulatur im Sinne einer Ähnlichkeit mit Nicht-Muskelzellen besitzt keine Querstreifen und wird deshalb auch **glatte Muskulatur** genannt. Sie bildet den kontraktilen Teil von **Magen**, **Darm**, **Uterus-** und **Arterienwänden** sowie vielen anderen Strukturen, von denen langsame, langanhaltende Bewegungen verlangt werden. Die glatte Muskulatur besteht aus Schichten stark verlängerter, spindelförmiger Zellen, die jeweils einen einzigen Zellkern besitzen. Die Zellen enthalten **Actin-** und **Myosin-II-Filamente**, die aber **kein** so streng **geordnetes Muster** wie in Skelett- und Herzmuskulatur und **keine Myofibrillen** bilden. Die Filamente bauen vielmehr einen lockerer angeordneten kontraktilen Apparat auf, der etwa parallel zur Längsachse der Zelle angeordnet ist; er ist unregelmäßig an der Plasmamembran befestigt, und zwar an scheibenartigen Verbindungsstellen, die benachbarte Zellen miteinander verkoppeln.

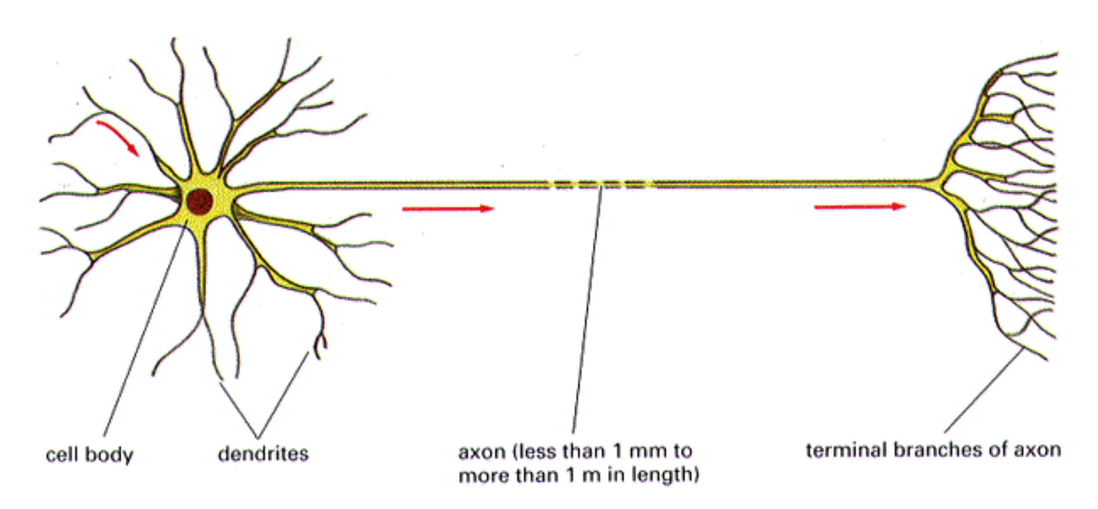
Der kontraktile Apparat in der glatten Muskulatur kontraktiert sich zwar **nicht so schnell** wie die Myofibrillen in quergestreiften Muskelzellen, aber er hat den Vorteil, daß er eine viel stärkere Verkürzung ermöglicht und deshalb **umfangreiche Bewegungen erzeugen kann**. Die Organisation der Actin-Filamente und des Myosins, die dies ermöglicht, ist nur unvollständig bekannt; ein Modell ist in der nächsten Abbildung gezeigt:



156: Modell für die Kontraktion der “glatten Muskulatur” am Beispiel einer Zelle

DES NERVENSYSTEMS

Nervenzellen sind - genauso wie Muskelzellen elektrisch erregbare Zellen. Die Hauptaufgabe von Nervenzellen ist der Empfang, die Weiterleitung und die **Übertragung von Signalen**. Um diese Aufgaben zu erfüllen haben Nervenzellen eine spezifische, langgestreckte Form: jedes **Neuron** besteht aus einem **Zellkörper**, der den Zellkern enthält, und einer Vielzahl langer, dünner Fortsätze, die strahlenförmig vom Zellkörper ausgehen. In der Regel gibt es **ein langes Axon** (bis zu 1 m lang), das die Signale vom Zellkörper zu entfernten Zielen weiterleitet, und mehrere kurze, **verzweigte Dendriten**, die antennenartig vom Zellkörper abstehen und eine große Oberfläche für den Empfang von Signalen aus Axonen anderer Nervenzellen bieten.



157: Eine Nervenzellen besteht aus Zellkörper und Axon

Auch der Zellkörper kann Signale empfangen. Meist zweigt sich das Axon an seinem entfernten Ende vielfach auf und kann dadurch seine Nachricht gleichzeitig an viele verschiedene Zellen weitergeben. Auch die Verzweigungen der Dendriten können sehr ausgedehnt sein, so daß in manchen Fällen ein Neuron bis zu **100.000 Eingänge** erhält.

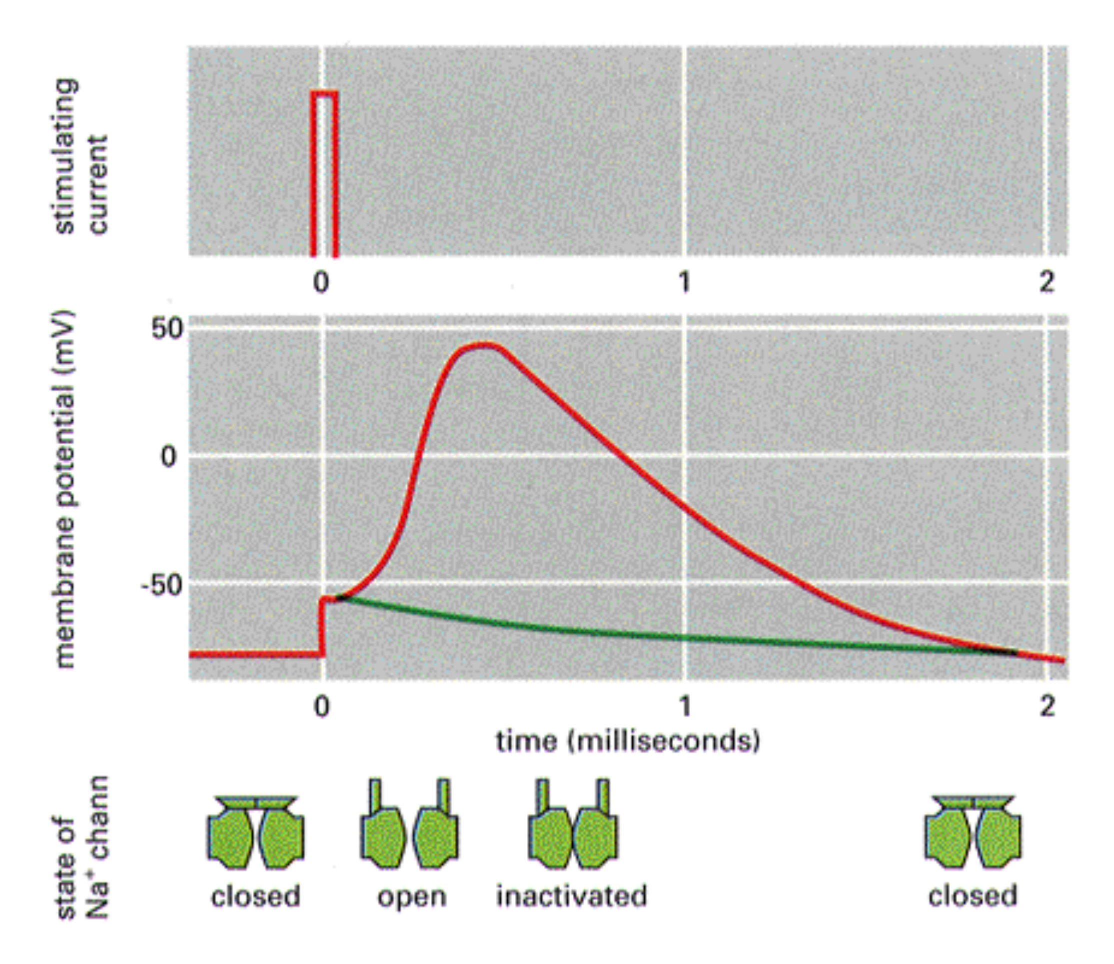
Die Signal-Form besteht stets aus **Änderungen im elektrischen Potential** über der Plasmamembran des Neurons. Größere Neurone verfügen über einen aktiven Signalübertragungsmechanismus: ein elektrischer Reiz, dessen Stärke einen bestimmten **Schwellenwert** übersteigt, löst eine elektrische Aktivität aus, die sich entlang der neuronalen

Plasmamembran ausbreitet und deren Intensität durch automatische Verstärkung über die gesamte Strecke aufrecht erhalten wird. Diese wandernde Welle elektrischer Erregung wird als **Aktionspotential** bezeichnet und kann eine Nachricht ohne Abschwächung von einem Ende des Neurons zum anderen mit **Geschwindigkeiten von 100 m/s** und mehr befördern.

Die Plasmamembranen aller elektrisch erregbaren Zellen enthalten **Spannungs-kontrollierte Kationenkanäle**, die für die Entstehung der Aktionspotentiale verantwortlich sind. Ausgelöst wird ein Aktionspotential durch eine **Depolarisation der Plasmamembran**, d.h. durch eine Verschiebung des Membranpotentials auf einen weniger negativen Wert.

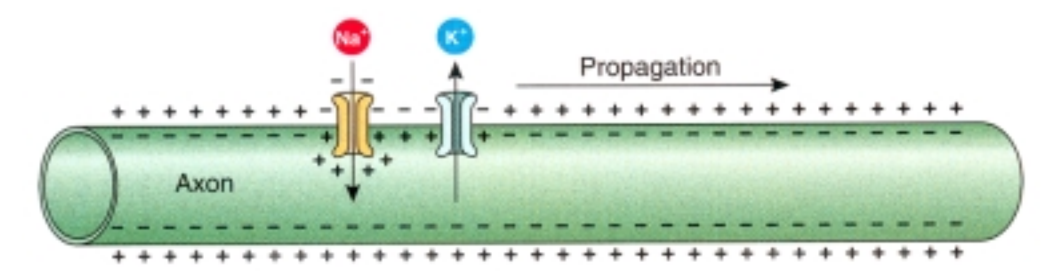
Ein Reiz, der eine Depolarisation auslöst, führt in Nervenzellen dazu, daß sich **Spannungs-kontrollierte Na^+-Kanäle öffnen** und einige Na^+ Ionen entlang ihrem elektrochemischen Gradienten in die Zelle eindringen. Durch diesen Einstrom positiver Ladungen wird die Membran weiter depolarisiert, und in einem sich selbst verstärkenden Prozess öffnen sich weitere Na^+-Kanäle und es dringen noch mehr Na^+-Ionen ein. Durch diesen selbst-verstärkenden Prozess wird innerhalb von Bruchteilen einer Sekunde das Membranpotential in dem betreffenden Membranbereich von einem Ruhewert von etwa -70 mV bis fast auf etwa +50 mV verschoben. Ab diesen Punkt geht der elektrochemische Gradient für Na^+-Ionen verloren.

Bereits während der Depolarisierungsphase werden die Na^+-Kanäle über einen automatischen Inaktivierungsmechanismus wieder verschlossen. Die Na^+-Kanäle verbleiben in einem inaktiven Zustand und sind so lange unfähig sich wieder zu öffnen, bis das Membranpotential wenigstens für einige Millisekunden seinen ursprünglichen negativen Wert von -70 mV wieder erreicht hat. Diese drei unterschiedlichen Zustände des Spannungs-kontrollierten Na^+-Kanals - **geschlossen**, **offen** und **inaktiviert** - sind essentiell für die Funktion der Nervenzellen und die Reizleitung.



158: Die drei Zustände der Spannungs-kontrollierten Na^+-Kanäle verursachen die Entstehung von Aktionspotentialen

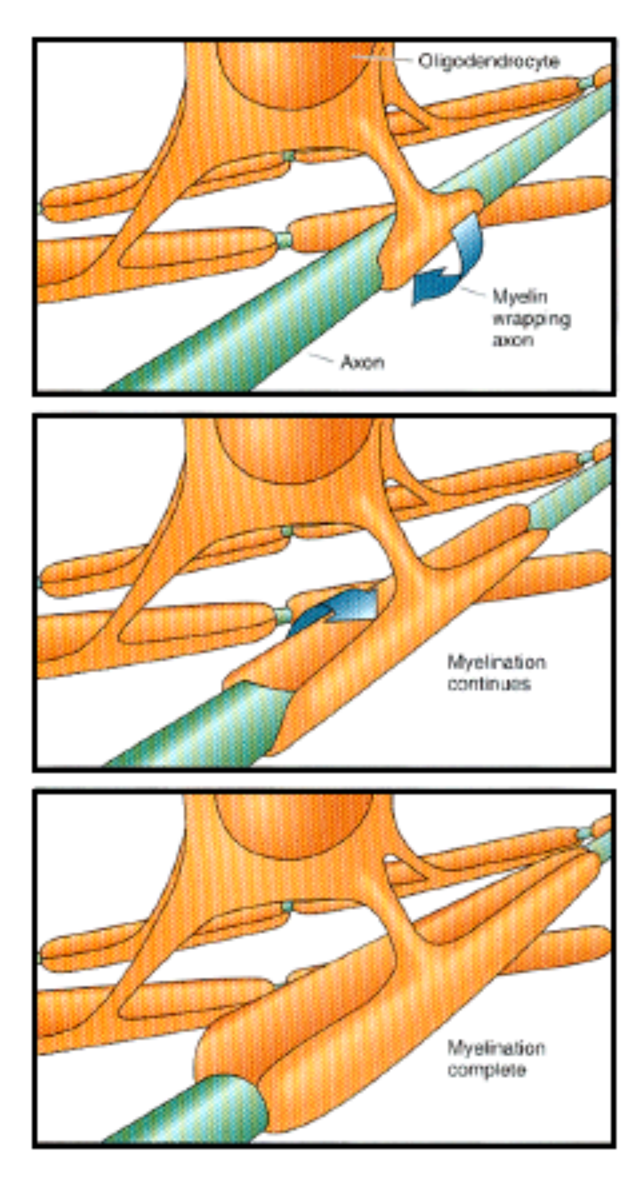
Um das Membranpotential möglichst schnell wieder auf seinen ursprünglichen negativen Wert zu regenerieren, werden **Spannungs-kontrollierte K^+-Kanäle** geöffnet, und der transiente Na^+-Einstrom wird schnell durch einen K^+-Ausstrom ausgeglichen. Diese K^+-Kanäle reagieren auf Änderungen des Membranpotentials sehr ähnlich wie die Na^+-Kanäle, aber mit einer etwas langsameren Kinetik, und werden deshalb auch **langsame** K^+-Kanäle genannt.



159: Reizleitung ist direktional und wird durch Na^+-Ein- und K^+-Ausstrom begleitet

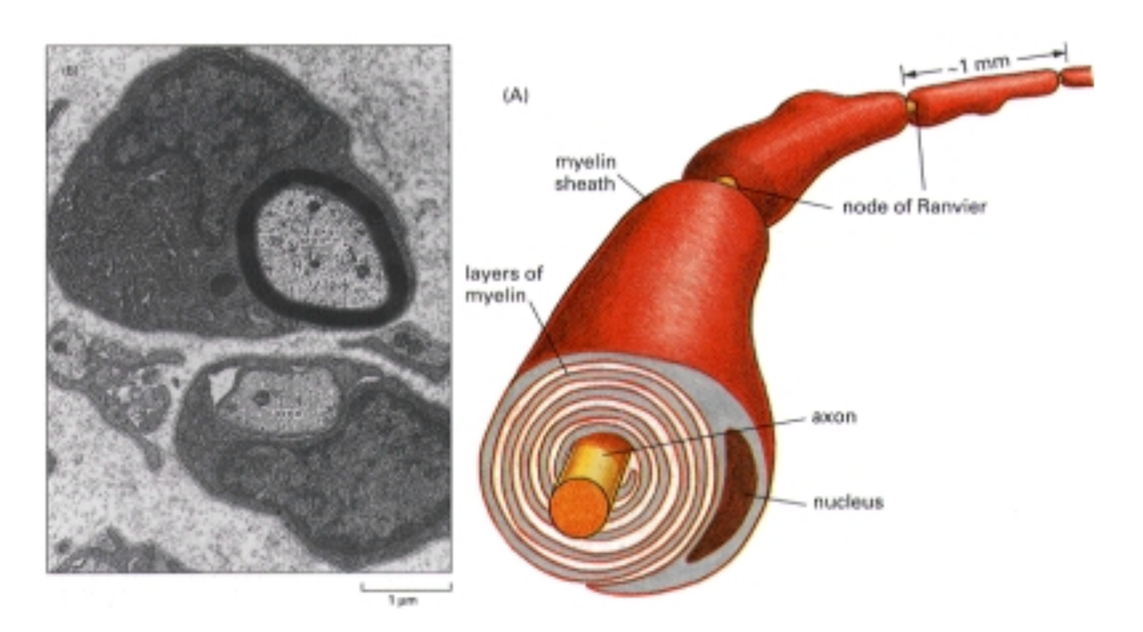
Die Axone vieler Wirbeltierneurone sind durch eine **Myelinscheide** isoliert, wodurch die Geschwindigkeit, mit der ein Axon ein Aktionspotential fortleitet, stark erhöht wird. Die Bedeutung der Myolinisierung zeigt sich besonders eindrücklich bei der **Multiplen Sklerose**, einer Krankheit, bei der die Myelinscheiden in einigen Regionen des Zentralnervensystems durch einen Autoimmun-Mechanismus zerstört werden. An diesen Stellen ist die Weiterleitung der Nervenimpulse stark verlangsamt, oft mit verheerenden neurologischen Auswirkungen.

Myolin wird von spezialisierten **Gliazellen** gebildet: (**Schwann'schen Zellen** in peripheren Nerven oder **Oligodendrozyten** im Zentralnervensystem).



160: Myelinisierung wird durch Gliazellen gewährleistet

Diese **Gliazellen** wickeln Schicht um Schicht ihre eigene Plasmamembran in engen Windungen um das Axon und isolieren damit die Axonmembran, so daß fast kein Strom mehr über sie abfließen kann. Außerdem geben Gliazellen gewisse Strukturen vor, da sie mit ihrer Membran mehrere Axone gleichzeitig myelinisieren können.



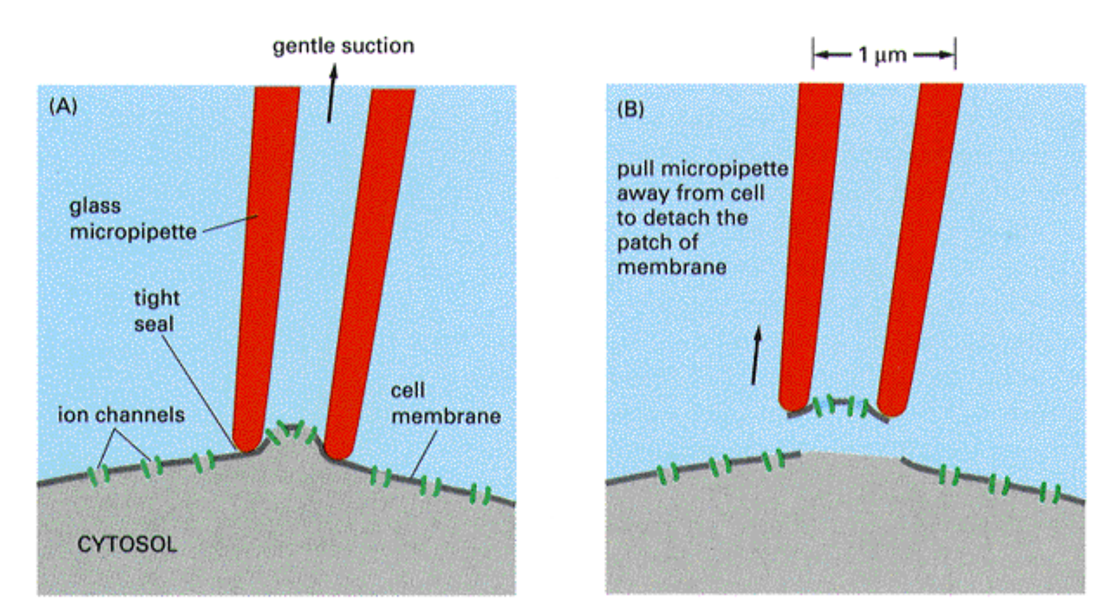
161: Die Myelinisierung führt zur Isolation der Neurone und zur Ausbildung der Ranvier'schen Schnürringen

In regelmäßigen Abständen ist diese Hülle von den **Ranvier'schen Schnürringen** unterbrochen; dort sind praktisch alle Na^{+}-Kanäle der Axon-Membran konzentriert. Da die eingehüllten Teile der Axonmembran außerordentlich gut isoliert sind, breitet sich eine Depolarisierung der Membran an einem Knoten sofort zum nächsten Knoten aus. Das Aktionspotential breitet sich also über ein myelinisiertes Axon aus, indem es von Knoten zu Knoten springt; ein Vorgang, der **saltatorische Erregungsleitung** genannt wird.

Diese Art der Erregungsleitung hat hauptsächlich zwei Vorteile: Aktionspotentiale werden schneller weitergeleitet und außerdem wird Energie gespart, weil die aktive Erregung auf die kleinen Regionen der Plasmamembran an den Ranvier'schen Schnürringen begrenzt bleibt.

Die Plasmamembranen von Nerven- und Muskelzellen enthalten Tausende von Spannungs-kontrollierten Na^+-Kanälen, und der Strom, der über die Membran fließt, stellt die Summe der einzelnen Ströme durch alle diese Kanäle dar. Bemerkenswert ist, daß man auch den Strom, der durch einen einzelnen Kanal fließt, sichtbar machen kann. Das leistet die ***Patch-Clamp*-Technik**, eine Methode, welche die Erforschung der Ionenkanäle revolutioniert hat.

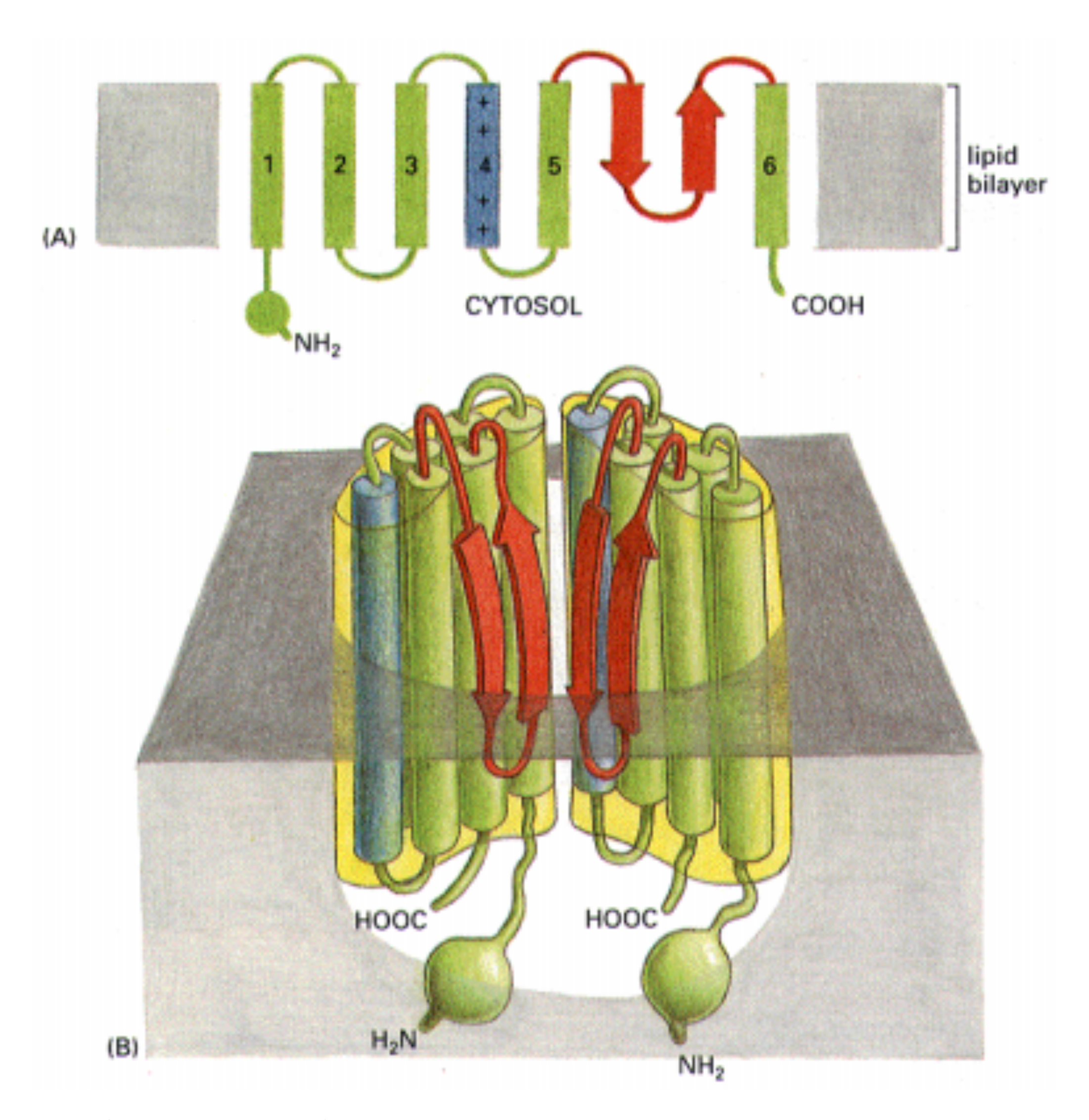
Mit dieser Methode gelingt es, den Transport durch **ein einzelnes Kanalprotein-Molekül** zu verfolgen, und zwar in dem kleinen Membranabschnitt, der die Öffnung einer Mikropipette bedeckt.



162: Die Patch-Clamp-Technik erlaubt Messungen an einzelnen Ionenkanälen

Mit dieser wirkungsvollen Technik lassen sich die Eigenschaften von Ionenkanälen in den verschiedensten Zelltypen untersuchen. Die Patch-Clamp Technik zeigt, daß sich die einzelnen Na^+-Kanäle nach dem **Alles-oder-Nichts-Prinzip** öffnen: wenn sie geöffnet sind, haben sie stets dieselbe große Leitfähigkeit, die einen Durchfluß von mehr als **8.000 Ionen pro Millisekunde** ermöglicht. Im Gesamtstrom, der durch die Membran einer Zelle fließt, spiegelt sich also nicht das Ausmaß der Kanalöffnung wider, sondern vielmehr **die Anzahl der** zu einem bestimmten Zeitpunkt **geöffneten Kanäle**.

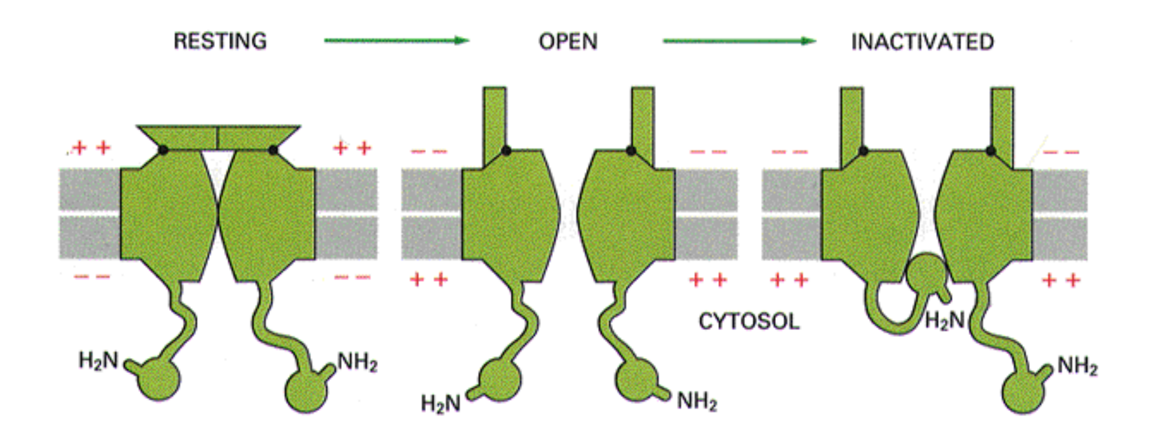
Spannungs-kontrollierte Kationenkanäle eignen sich besonders für Untersuchungen der Beziehung zwischen Struktur und Funktion von Spannungs-kontrollierten Ionenkanälen, da sie nicht aus einer langen Polypeptidkette, sondern aus **vier identischen Untereinheiten** zusammengesetzt sind. Jede Untereinheit des K^+-Kanals besitzt **sechs Membranüberspannende α-Helices**; erstaunlicherweise scheint aber keine von ihnen die Pore für das Kation auszukleiden. Untersuchungen an K^+-Kanal-Proteinen, die mit Hilfe der **rekombinanten DNA-Technik** verändert wurden, legen nahe, daß ein Segment aus **20 Aminosäuren**, das die Membran als antiparalleles **ß-Faltblatt** durchzieht, die Pore auskleidet: wenn dieses Segment zwischen zwei Ionen-Kanälen mit unterschiedlichen Permeabilitätseigenschaften ausgetauscht wird, zeigt sich, daß die Permeabilitätseigenschaften allein von diesem Segment abhängen.



163: K^+-Ionenkanal: von der tetrameren Struktur ist nur das Dimer gezeigt

Mit **rekombinanten DNA-Technik** wurden weitere funktionell wichtige Abschnitte der Spannungs-kontrollierten K^+-Kanal-Proteine identifiziert: die 19 Aminosäuren am Aminoende sind an der schnellen Kanal-Inaktivierung beteiligt. Verändert man diese Region, ändert sich die Inaktivierungskinetik des Kanals; wird die Region entfernt, fehlt die Inaktivierung ganz.

Erstaunlicherweise kann man im zweiten Fall die Inaktivierung wiederherstellen, indem man die cytoplasmatische Seite der Plasmamembran mit einem kleinen synthetischen Peptid, das dem fehlenden Aminoende entspricht, in Kontakt bringt. Diese Ergebnisse legen nahe, daß das Aminoende jeder K^+-Kanal-Untereinheit die cytoplasmatische Seite der Pore wie ein angebundener Ball bald nach dem Öffnen wieder verschließt. Die schnelle Inaktivierung Spannungs-kontrollierter Na^+-Kanäle scheint ähnlich zu funktionieren, obwohl dort wohl ein anderes Segment des Proteins beteiligt ist.



164: Das aminoterminale Ende der K^+-Kanal-Proteine verschließt die Pore

Nervensignale werden an spezialisierten Kontaktzonen, den **Synapsen**, von Zelle zu Zelle übertragen. Normalerweise geschieht dies indirekt. Die Zellen sind elektrisch voneinander isoliert, indem die **präsynaptische** Zelle von der **postsynaptischen Zelle** durch einen schmalen **synaptischen Spalt** getrennt ist. Eine Änderung im elektrischen Potential der präsynaptischen Zelle veranlaßt diese zur Freisetzung (**Exozytose**) eines kleinen Signalmoleküls, das als **Neurotransmitter** bezeichnet wird.

Der Neurotransmitter **diffundiert** rasch über den synaptischen Spalt und löst eine elektrische Änderung an der postsynaptischen Zelle aus, indem er dort an **Transmitter-kontrollierte Ionenkanäle** bindet. Freier Neurotransmitter wird schnell von spezifischen Enzymen im synaptischen Spalt inaktiviert oder von der präsynaptischen Zelle oder umgebenden Gliazellen resorbiert. Die Wiederaufnahme erfolgt durch eine Reihe von Na^+-abhängigen **Neurotransmitter-Carrier-Proteinen**. Das rasche Entfernen des Neurotransmitters gewährleistet sowohl die **räumliche** als auch die **zeitliche Präzision der Signalübertragung** an der Synapse: es verhindert die Beeinflussung von Nachbarneuronen durch den Neurotransmitter und macht den synaptischen Spalt frei.

Transmitter-kontrollierte Ionenkanäle sind darauf spezialisiert, an chemischen Synapsen extrazelluläre **chemische Reize** schnell in **elektrische Signale** umzuwandeln. Die Kanäle treten in der Plasmamembran der postsynaptischen Zelle in der Nähe der Synapse gehäuft auf; sie öffnen sich vorübergehend als Antwort auf die Bindung des Neurotransmittermoleküls und erzeugen so eine kuze Permeabilitätsänderung in der Membran. Transmitter-kontrollierte Kanäle sind relativ unempfindlich gegenüber Änderungen des Membranpotentials; sie verändern nur lokal die **Durchlässigkeit der Membran**, und wie stark sich dadurch das Membranpotential ändert, hängt davon ab, **wieviel** Neurotransmitter an der Synapse ausgeschüttet wird und **wie lange** er dort bleibt. Ein Aktionspotential wird nur dann ausgelöst, wenn das Membranpotential an dieser Stelle stark genug ansteigt, um die in der Membran derselben Zelle vorhandenen Spannungs-kontrollierten Ionenkanäle in genügend großer Anzahl zu öffnen.

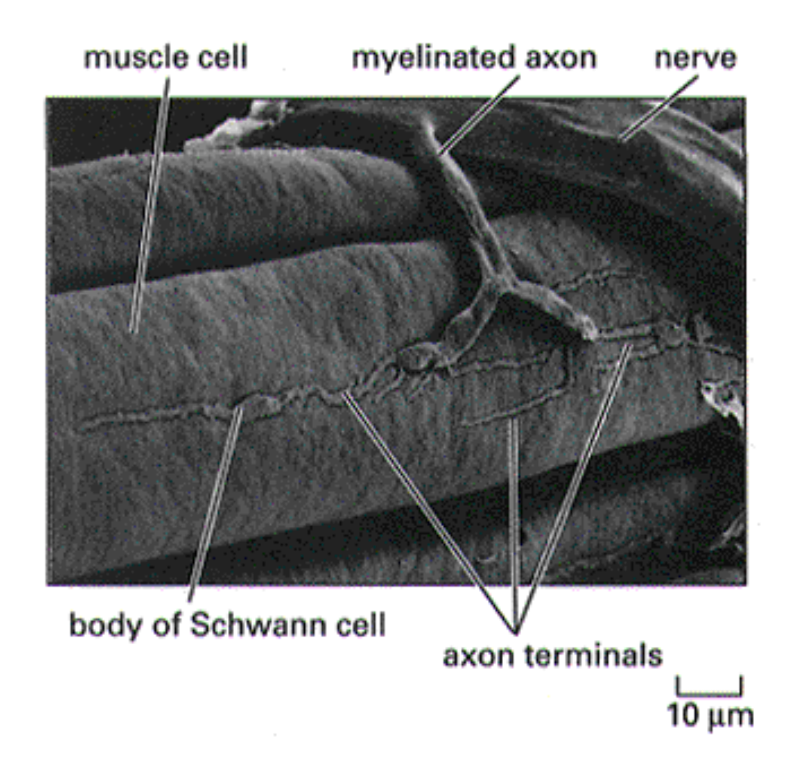
Transmitter-kontrollierte Ionenkanäle unterscheiden sich untereinander in wichtigen Punkten. Erstens besitzen sie als Rezeptoren eine **hochselektive Bindungsstelle für den Neurotransmitter**, der von der präsynaptischen Nervenendigung ausgeschüttet wird. Zweitens lassen sie als Kanäle **ausschließlich bestimmte Ionen** die Membran passieren, was die Art der postsynaptischen Antwort bestimmt:

1. **Erregende Neurotransmitter**, wie Acetylcholin, Glutamat und Serotonin, öffnen Kationenkanäle und verursachen dadurch einen Na^+-Einstrom, der die Membran bis zur Schwelle für die Auslösung eines Aktionspotentials depolarisiert.

2. **Hemmende Neurotransmitter**, wie γ-Aminobuttersäure (GABA) und Glycin öffnen dagegen Cl^--Kanäle und unterdrücken damit die elektrische Aktivität, indem sie die postsynaptische Membran polarisiert halten.

Bemerkung:
Das Öffnen von Cl^--Kanälen hyperpolarisiert die Membran, indem negativ geladene Cl^--Ionen in die Zelle eingelassen werden. Das Öffnen von Cl^--Kanälen erschwert demnach die Depolarisation der Membran und damit die Erregung der Zelle. Welch wichtige Rolle die hemmenden Neurotransmitter spielen, zeigen die Auswirkungen von Giftstoffen, die deren Wirkung hemmen: **Strychnin**, beispielsweise, das an Glycin-Rezeptoren bindet und die Wirkung von Glycin blockiert, verursacht Muskelkrämpfe, Muskelzuckungen und schließlich den Tod.

Das am besten untersuchte Beispiel für einen Transmitter-kontrollierten Ionenkanal ist der **Acetylcholinrezeptor der Skelettmuskelzellen**. Dieser Kanal öffnet sich vorübergehend als Reaktion auf die Acetylcholin-Freisetzung aus der Nervenendigung der **neuromuskulären Endplatte**, der spezialisierten chemischen Synapse zwischen einem **Motoneuron** und einem **Skelettmuskel**. Diese Synapse wurde eingehend untersucht, da sie elektrophysiologischen Untersuchungen weit zugänglicher ist als die meisten Synapsen im zentralen Nervensystem.



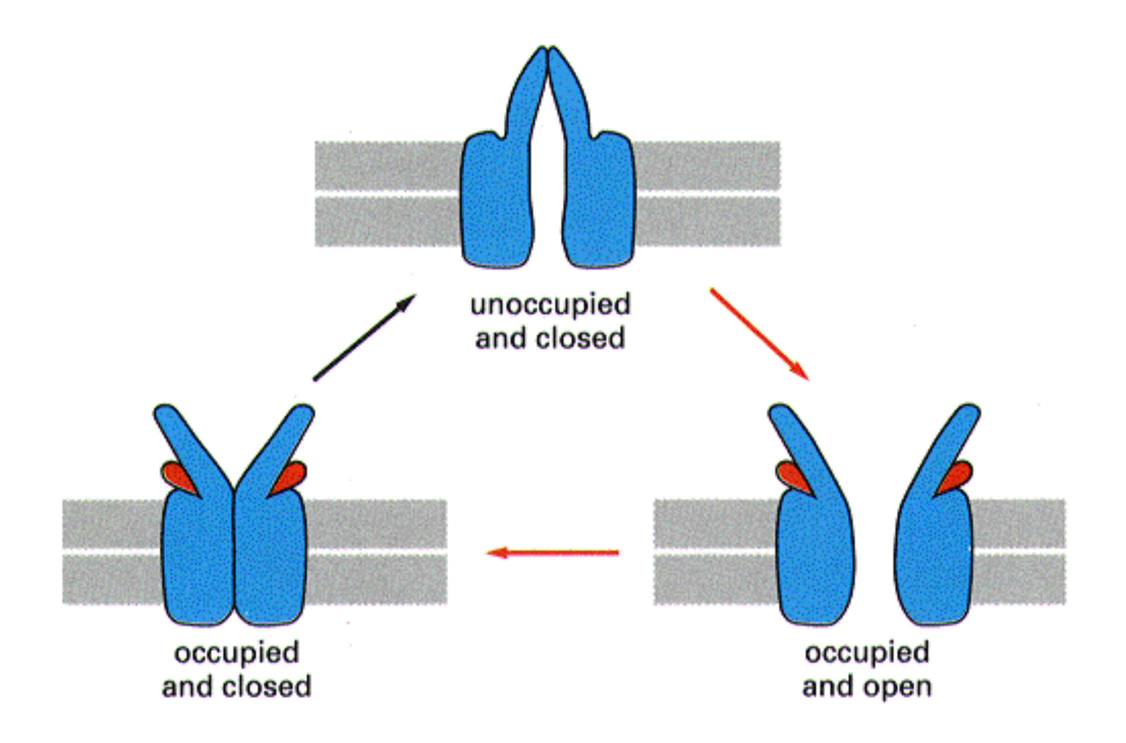
165: Spezifischer Kontakt zwischen einem Motorneuron und einer Skelettmuskelzelle an einer neuromuskulären Endplatte

Der Acetylcholinrezeptor nimmt in der Geschichte der Ionenkanäle einen besonderen Platz ein. Er war der erste

- Ionenkanal, den man isoliert und dessen Sequenz bestimmt wurde
- den man funktionsfähig in künstliche Lipid-Doppelschichten einbaute
- für den das elektrische Signal eines einzigen Kanals registriert wurde
- für den das entsprechende Gen kloniert und sequenziert wurde

Für den raschen Fortschritt bei der Reinigung und Charakterisierung dieses Rezeptors gibt es zwei Gründe: zum einen gibt es eine ungewöhnlich **reiche Quelle** des Rezeptors in den elektrischen Organen von Zitterrochen und elektrischen Fischen. Zum zweiten gibt es im Gift bestimmter Schlangen Nervengifte wie das **α-Bungarotoxin**, die sehr spezifisch und mit hoher Affinität (Ka = 10^9 Liter/Mol) an den Rezeptor binden.

Mit ihrer Hilfe läßt sich das Protein durch Affinitätschromatographie reinigen. Fluoreszenzfarbstoffe oder radioaktiv- oder Fluoreszenzmarkiertes α-Bungarotoxin kann man außerdem dazu benutzen, die Acetylcholinrezeptoren zu lokalisieren und zu zählen. Wie man auf diese Weise zeigen konnte, sind die Rezeptoren in der Plasmamembran der Muskelzellen im Bereich der neuromuskulären Endplatte dicht gepackt (etwa 20.000 Rezeptormoleküle je μm^2); in anderen Bereichen derselben Membran liegen dagegen nur relativ wenige Rezeptoren.



166: Die drei Zustände des Acetylcholin-Rezeptors

Der Acetylcholinrezeptor des Skelettmuskels ist aus **fünf Transmembran-Polypeptiden** (α–δ) zusammengesetzt; von diesen sind zwei identisch, die anderen drei sind untereinander verschieden. Kodiert werden die Polypeptide von **vier getrennten Genen**, die aber erstaunlich homolog sind und daher vermutlich von einem einzigen Vorläufer-Gen abstammen. Die beiden identischen Polypeptide (α) des Pentamers haben **Bindungsstellen für Acetylcholin**. Wenn zwei Acetylcholin-Moleküle an den Gesamtkomplex binden, lösen sie eine **Konformationsänderung** aus, die zum **Öffnen des Kanals** führt.

Für ungefähr eine Millisekunde bleibt der Kanal offen; dann schließt er sich wieder. Die geöffnete Form ist, wie beim Spannungskontrollierten Na^+-Kanal, sehr kurzlebig und kippt schnell wieder in die energetisch günstigere, geschlossene Form zurück. Anschließend dissoziieren die Acetylcholin-Moleküle von dem Rezeptor und werden von dem Enzym **Acetylcholinesterase gespalten**, das in der neuromuskulären Endplatte vorliegt. Wenn der Acetylcholinrezeptor von dem gebundenen Transmitter befreit ist, kehrt er wieder in seinen ursprünglichen Ruhezustand zurück.

Die fünf Untereinheiten sind ringförmig angeordnet und bilden einen wassergefüllten Kanal durch die Membran, der als enge Pore durch die Lipid-Doppelschicht mit weiten zylindrischen Eingängen ausgestaltet ist. Eine Ansammlung negativ geladener Aminosäurereste an beiden Enden der Pore hält negative Ionen fern, während positive Ionen, deren **Durchmesser 0,65 nm** nicht übersteigt, ungehindert passieren dürfen. Dies gilt hauptsächlich für **Na^+**-, **K^+**- und **Ca^{2+}**-Ionen. Die Selektivität für einzelne Kationen ist gering, und wieviel die einzelnen Kationen zu dem durch den Kanal fließenden Strom beitragen, hängt vor allem von ihrer Konzentration und ihrer elektrochemischen Triebkraft ab. Diese Triebkraft ist für K^+-Ionen gering und die geringe Konzentration der Ca^{2+}-Ionen reicht nicht aus, um nennenswert zur Depolarisierung beizutragen. Insgesamt führt also **das Öffnen der Acetylcholinrezeptor-Kanäle** zu einem starken, in die Zelle **gerichteten Fluß von Na^+-Ionen** (der Spitzenwert liegt bei 30.000 Ionen je Kanal und Millisekunde). Dieser Ionenfluß ist die Ursache für die Depolarisierung der Membran, die für den Muskel das Signal zur Kontraktion darstellt.

Die Ionenkanäle, die sich unmittelbar als Antwort auf die Neurotransmitter Acetylcholin, Serotonin, GABA und Glycin öffnen, besitzen strukturell ähnliche Untereinheiten. Das läßt auf eine entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaft schließen und darauf, daß, trotz ihrer unterschiedlichen Bindungseigenschaften für Neurotransmitter und ihrer unterschiedlichen Ionenselektivität, ihre transmembranalen Poren wahrscheinlich ähnlich aufgebaut sind.

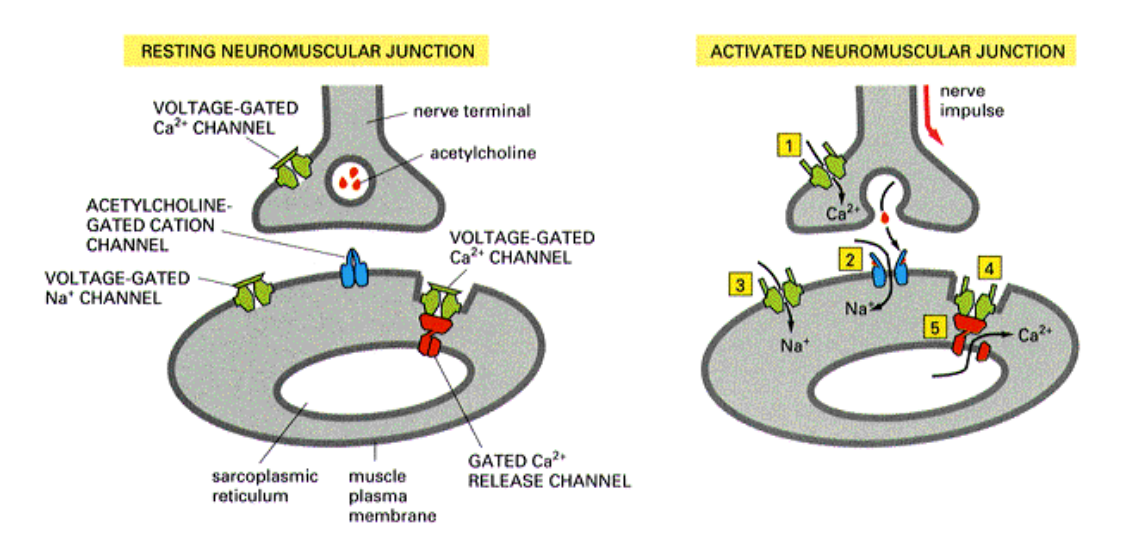
Jeder Transmitter-kontrollierte Kanal wird entweder von verschiedenen Genen kodiert, oder durch unterschiedliches Spleißen der RNA eines einzigen Gens zustande kommen. Diese werden in verschiedenen Kombinationen zum Kanal zusammengesetzt und bilden so eine außerordentlich unterschiedliche Sammlung von Kanal-Unterarten, die sich in ihrer Liganden-Affinität, ihrer Kanal-Leitfähigkeit, ihrer Öffnungs- und Schließ-Geschwindigkeit und ihrer Empfindlichkeit gegenüber Arzneimitteln und Giften unterscheiden.

Wirbeltier-Neurone haben beispielsweise einen Acetylcholin-kontrollierten Ionenkanal, der sich von dem der Muskelzellen darin unterscheidet, daß er gewöhnlich aus zwei Untereinheiten eines Typs und drei Untereinheiten eines anderen Typs aufgebaut ist; aber es gibt mindestens sieben Gene, die für verschiedene Formen des ersten Typs kodieren und mindestens drei, die für verschiedene Formen des zweiten kodieren. Hinzu kommen noch die weiteren Unterschiede durch unterschiedliches Spleißen der RNA dieser Gene. Untergruppen Acetylcholin-empfindlicher Neurone, die unterschiedliche Aufgaben im Gehirn zu erfüllen haben, sind durch verschiedene Kombinationen dieser Untereinheiten gekennzeichnet.

Dies macht es im Prinzip, und zum Teil auch schon in der Praxis, möglich, Arzneimittel zielgenau gegen bestimmte eng umschriebene Gruppen von Neuronen oder Synapsen zu entwerfen und dadurch ganz bestimmte Hirnfunktionen auf bestimmte Weise zu beeinflussen. Tatsächlich sind Transmitter-kontrollierte Ionenkanäle seit langem wichtige Angriffspunkte für Arzneimittel. Zum Beispiel kann ein Chirurg Muskeln für die Dauer einer Operation zum Erschlaffen bringen, indem er die Acetylcholinrezeptoren der Skelettmuskelzellen mit Curare, einem pflanzlichen Wirkstoff, der von südamerikanischen Indianern als Pfeilgift verwendet wurde, blockiert. Die meisten Arzneimittel gegen Schlaflosigkeit, Angstzustände, Depressionen und Schizophrenie entfalten ihre Wirkungen an chemischen Synapsen, und viele von ihnen binden an Transmitterkontrollierte Kanäle: Sowohl Barbiturate als auch Tranquillizer, wie Valium und Librium zum Beispiel, binden an GABA-Rezeptoren und verstärken dadurch die hemmende Wirkung von GABA, indem schon geringere Mengen des Neurotransmitters ausreichen, um Cl^--Kanäle zu öffnen.

Die neuen Erkenntnisse der Molekularbiologie über Verschiedenheit und strukturelle Einzelheiten von Ionenkanälen lassen auf die Entwicklung einer neuen Generation von Psychopharmaka zur Linderung der Leiden bei Geisteskrankheiten hoffen, die noch selektiver wirken.

Wie wichtig Ionenkanäle für elektrisch erregbare Zellen sind, läßt sich sehr gut an dem Vorgang zeigen, duch den ein Nervenimpuls eine Muskelzelle zur Kontraktion anregt. Für diese scheinbar einfache Reaktion müssen fünf verschiedene Gruppen von Ionenkanälen nacheinander aktiviert werden - und das innerhalb weniger Millisekunden.



167: Zeitliche Abfolge der verschiedenen Ereignisse an NMEP

1. Der ganze Vorgang wird eingeleitet, sobald ein Nervenimpuls die Nervenendigung erreicht und dort die Plasmamembran depolarisiert. Die Depolarisation öffnet vorübergehend Spannungs-kontrollierte Ca^{2+}-Kanäle in dieser Membran. Da die Ca^{2+}-Konzentration außerhalb der Zellen immer mehr als 1.000-mal höher ist als die der freien Ca^{2+}-Ionen in der Zelle, strömt Ca^{2+} in die Nervenendigung ein. Die steigende Ca^{2+}-Konzentration im Cytoplasma der Nervenendigung löst in einem bestimmten Bereich die Ausschüttung von Acetylcholin in den synaptischen Spalt aus.
2. Das freigesetzte Acetylcholin bindet an Acetylcholinrezeptoren in der postsynaptischen Plasmamembran der Muskelzelle und öffnet vorübergehend die an die Rezeptoren gekoppelten Kationenkanäle. Durch das Einfließen von Na^{+} wird die Membran in einem begrenzten Bereich depolarisiert.
3. Wenn die Plasmamembran der Muskelzelle lokal depolarisiert wird, öffnen sich die ebenfalls in dieser Membran vorhandenen Spannungs-kontrollierten Na^{+}-

Kanäle, so daß noch mehr Na^+ einströmt und die Membran noch weiter depolarisiert wird. Das führt wiederum zum Öffnen weiterer benachbarter Na^+-Kanäle, und es entsteht eine Depolarisierung, die sich schließlich über die gesamte Plasmamembran ausbreitet.

4. Die allgemeine Depolarisation der Muskelzellmembran aktiviert Spannungskontrollierte Ca^{2+}-Kanäle in spezialisierten Membranabschnitten (den transversalen T-Tubuli) dieser Membran. Dies veranlaßt wiederum Ca^{2+}-freisetzende Kanäle in angrenzenden Abschnitten des Sarkoplasmatischen Reticulums, sich vorübergehend zu öffnen um das im Sarkoplasmatischen Reticulum gespeicherte Ca^{2+} ins Cytoplasma freizusetzen. Der plötzliche Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration im Cytoplasma löst dann bei den Myofibrillen der Muskelzelle die Kontraktion aus. Wie die Aktivierung der Spannungskontrollierten Ca^{2+}-Kanäle in der Membran der T-Tubuli zum Öffnen der Ca^{2+}-freisetzenden Kanäle im Sarcoplasmatischen Reticulum führt, ist noch unklar. Die beiden Membranen liegen allerdings eng beieinander und die beiden Kanaltypen liegen zusammen in einer spezialisierten Struktur. Deshalb ist es möglich, daß eine spannungsinduzierte Änderung der Konformation des Ca^{2+}-Kanals in der Plasmamembran den Ca^{2+}-freisetzenden Kanal im Sarkoplasmatischen Reticulum direkt über eine mechanische Kopplung öffnet.

Schon die Auslösung einer Muskelkontraktion durch ein Motoneuron ist also ein komplexer Vorgang; ein noch viel ausgeklügelteres Zusammenspiel der Ionenkanäle braucht ein Neuron, um eine große Zahl von Eingangssignalen an Synapsen zu integrieren und ein entsprechendes Ausgangssignal zu berechnen.

Ein einziges Neuron im Zentralnervensystem kann Eingänge von vielen tausend anderen Neuronen erhalten. Beispielsweise bilden mehrere tausend Nervenendigungen Synapsen an einem einzigen typischen Motoneuron des Rückenmarks; sein Zellkörper und seine Dendriten sind praktisch vollständig mit Synapsen bedeckt. Einige dieser Synapsen übertragen Signale aus dem Gehirn oder Rückenmark; andere übermitteln sensorische Informationen von den Muskeln oder der Haut. Das Motoneuron muß die Informationen aus diesen verschiedenen Quellen miteinander kombinieren und entweder mit dem Aussenden von Aktionspotentialen entlang seinem Axon reagieren,oder still bleiben.

Von den vielen Synapsen eines Neurons werden einige es eher erregen, andere es eher hemmen. Der Neurotransmitter, der an einer erregenden Synapse ausgeschüttet wird, löst eine kleine Depolarisation der postsynaptischen Membran aus, ein **excitatorisches postsynaptisches Potential** (excitatorisches PSP). Andererseits löst der Neurotransmitter, der an einer hemmenden Synapse ausgeschüttet wird, im allgemeinen eine kleine Hyperpolarisation aus, die **inhibitorisches PSP** genannt wird. Da die Membranen von Dendriten und Soma der meisten Neurone nur wenige Spannungs-kontrollierte Na^+-Kanäle besitzen, löst ein einzelnes excitatorisches PSP normalerweise noch kein Aktionspotential aus. Statt dessen wird jedes ankommende Signal als **lokales PSP** von abgestufter Amplitude abgebildet, die mit wachsender Entfernung vom Ort der Synapse abnimmt. Laufen mehrere Signale gleichzeitig in verschiedenen Synapsen am selben Abschnitt des Dendritenbaums ein, entspricht das PSP in deren Nachbarschaft etwa der Summe der einzelnen PSPs, wobei inhibitorische PSPs einen negativen Beitrag zum Gesamt-PSP leisten. Die PSPs aus jeder Region breiten sich passiv aus und überlagern sich auf dem Zellkörper. Verglichen mit dem Dendritenbaum ist die Oberfläche des Zellkörpers klein, und deshalb ist das Membranpotential am Zellkörper ziemlich einheitlich und setzt sich zusammen aus den Auswirkungen aller Signale, die auf die Zelle einströmen, gewichtet nach der Entfernung ihrer Synapsen vom Zellkörper. Das postsynaptische Summenpotential (**Summen-PSP**) stellt daher die räumliche Summation aller empfangenen Reize dar. Wenn erregende Eingänge überwiegen, ist das Summen-PSP eine **Depolarisation**; überwiegen inhibitorische Eingänge, ist es gewöhnlich eine **Hyperpolarisation**.

Eine entscheidende Eigenschaft des Nervensystems ist die Fähigkeit, zu lernen und sich zu erinnern; eine Eigenschaft, die anscheinend hauptsächlich von langfristigen Änderungen an bestimmten Synapsen abhängt. Wir beenden dieses Kapitel mit der Besprechung eines bemerkenswerten Ionenkanals, der bei einigen Formen des Lernens und des Gedächtnisses eine besondere Rolle spielt. Er kommt an vielen Synapsen im zentralen Nervensystem vor und wird sowohl von der Spannung als auch von dem Neurotransmitter Glutamat kontrolliert. Er ist außerdem der Wirkort für das Psychopharmakon Phencyclidin, das auch unter dem Namen „angel dust" bekannt ist.

Praktisch alle Tiere können lernen, aber Säuger scheinen dies außerordentlich gut zu können (so möchten wir zumindest gerne glauben). Beim Säugetier spielt der **Hippocampus**, eine Region der Hirnrinde, beim **Lernen** eine besondere Rolle: wird er auf beiden Seiten zerstört, können praktisch keine neuen Gedächtnisinhalte mehr ausgebildet werden, auch wenn früher erworbene erhalten bleiben. Übereinstimmend damit zeigen einige Synapsen im Hippocampus bei wiederholtem Gebrauch drastische funktionelle Änderungen: während gelegentlich in den präsynaptischen Zellen auftretende einzelne Aktionspotentiale keine bleibenden Spuren hinterlassen, verursacht eine kurze Salve von Aktionspotentialen eine Langzeitpotenzierung (long-term potentiation LTP), so daß die folgenden einzelnen Aktionspotentiale in den präsynaptischen Zellen eine stark erhöhte Reaktion in den postsynaptischen Zellen auslösen. Der Effekt kann Stunden, Tage oder Wochen anhalten, je nach Anzahl und Intensität der Aktionspotential-Salven. Nur die Synapsen, die dabei aktiviert wurden, zeigen die Potenzierung, diejenigen, die auf derselben postsynaptischen Zelle stumm geblieben sind, sind nicht betroffen. Kommt aber, während die Zelle eine Salve wiederholter Reizung über eine Gruppe von Synapsen erhält, ein einzelnes Aktionspotential an einer anderen Synapse auf ihrer Oberfläche an, so tritt an dieser Synapse auch Langzeitpotenzierung auf, obwohl ein einzelnes Aktionspotential dort zu einer anderen Zeit keine bleibenden Spuren hinterlassen würde.

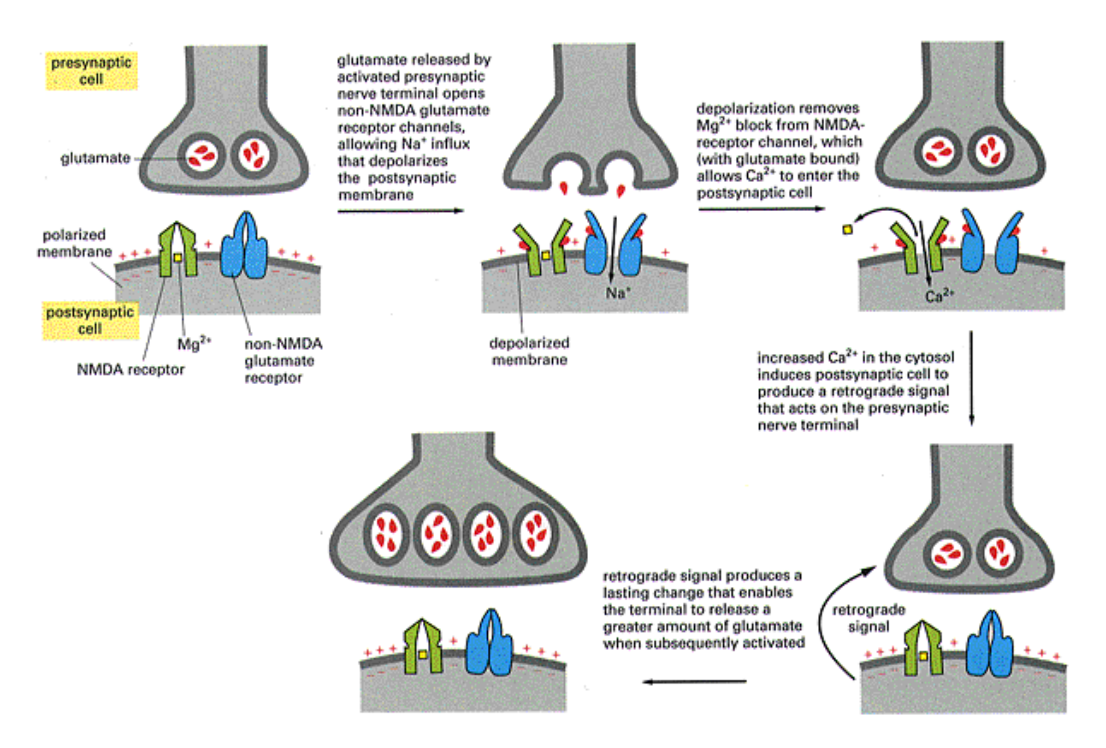
Die grundlegende Regel im Hippocampus ist offenbar, daß immer dann Langzeitpotenzierung auftritt, wenn eine präsynaptische Zelle ein- oder mehrfach feuert, während die Membran der postsynaptischen Zelle stark depolarisiert ist (entweder durch wiederholte Erregung durch dieselbe präsynaptische Zelle oder auf anderem Wege). Es gibt gute Hinweise darauf, daß diese Regel das Verhalten einer speziellen Gruppe von Ionenkanälen in der postsynaptischen Membran widerspiegelt. Im Zentralnervensystem der Säuger ist **Glutamat** der häufigste erregende Neurotransmitter; und im Hippocampus, wie anderswo auch, fließt der Hauptteil des für die excitatorischen PSPs verantwortlichen depolarisierenden Stroms durch Glutamat-kontrollierte Ionenkanäle, die auf ganz konventionelle Weise arbeiten. Aber der Strom hat außerdem eine zweite, interessantere Komponente, die von einer besonderen Untergruppe von Glutamatrezeptoren vermittelt wird. Diese Gruppe

nennt man wegen ihrer selektiven Erregbarkeit durch das künstliche Glutamat-Analogon N-Methyl-D-Aspartat **NMDA-Rezeptoren**. Die NMDA-Rezeptor-Kanäle sind doppelt gesperrt und öffnen sich nur, wenn zwei Bedingungen gleichzeitig zutreffen: Glutamat muß am Rezeptor gebunden und die Membran muß stark depolarisiert sein. Diese zweite Bedingung muß erfüllt sein, damit das Mg^{2+}, das normalerweise den ruhenden Kanal blockiert, freigesetzt wird, und das bedeutet, daß die NMDA-Rezeptoren nur aktiviert werden, wenn auch die konventionellen Glutamat-gesteuerten Ionenkanäle aktiviert werden und die Membran depolarisieren. Die NMDA-Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Langzeitpotenzierung. Werden sie durch einen speziellen Inhibitor blockiert, tritt keine Langzeitpotenzierung auf, obwohl die normale synaptische Transmission weiterhin funktioniert. Tiere, die mit diesem Inhibitor behandelt wurden, zeigen bestimmte Ausfälle in ihrem Lernvermögen, verhalten sich aber sonst ganz normal.

Wie vermitteln die NMDA-Rezeptoren diesen bemerkenswerten Effekt? Die Antwort ist, daß diese Kanäle in geöffnetem Zustand hochgradig durchlässig für Ca^{2+} sind, das in der postsynaptischen Zelle als intrazellulärer Botenstoff wirkt und dort eine Kaskade von Veränderungen auslöst, die schließlich für die Langzeitpotenzierung verantwortlich sind. Deshalb kann man die Langzeitpotenzierung auch verhindern, indem man den Ca^{2+}-Chelator EGTA in die postsynaptische Zelle injiziert und so den intrazellulären Ca^{2+}-Spiegel künstlich niedrig hält; oder man kann die Langzeitpotenzierung induzieren, indem man den extrazellulären Ca^{2+}-Spiegel vorübergehend künstlich stark erhöht.

Obwohl die Langzeitveränderungen in der postsynaptischen Zelle hervorgerufen werden, beeinflussen sie auch die präsynaptische Zelle, so daß diese bei einer nachfolgenden Reizung mehr Glutamat freisetzt als normalerweise. Bisher ist die Art der bleibenden Veränderung in der präsynaptischen Zelle noch unklar, aber sicherlich muß bei der Induktion der Langzeitpotenzierung ein Signal retrograd von der postsynaptischen zur präsynaptischen Zelle übertragen werden. Die Natur des retrograden Botenstoffs ist ebenfalls unbekannt; sowohl Stickstoffmon-

oxid (NO) als auch Kohlenmonoxid (CO) werden als Kandidaten diskutiert. Ein vorläufiges Modell für einige der an der Induktion der Langzeitpotenzierung beteiligten Schritte ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Zusätzlich zu den in der Abbildung gezeigten langfristigen Änderungen in der präsynaptischen Zelle treten auch in der postsynaptischen Zelle langanhaltende Änderungen auf, die zur Langzeitpotenzierung beitragen.



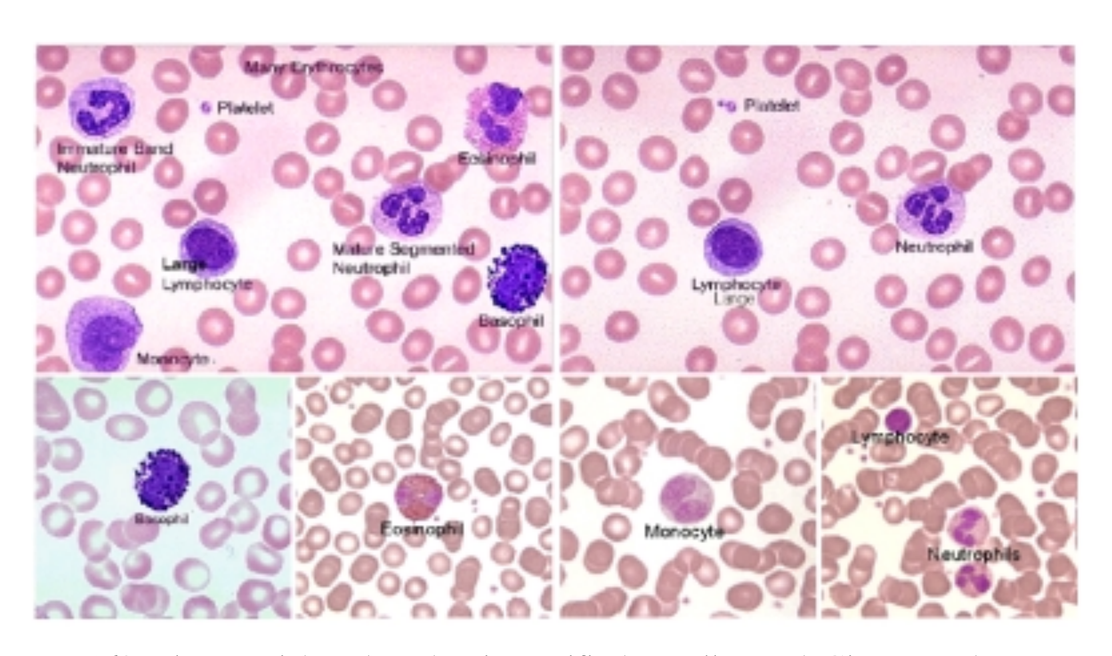
168: Die entscheidenden Ereignisse bei der Langzeit-Potenzierung

Es gibt Hinweise darauf, daß, wie im Hippocampus, auch in anderen Teilen des Gehirns die NMDA-Rezeptoren für das Lernen und verwandte Phänomene wichtig sind.

Die an den Synapsen ausgeschütteten Neurotransmitter können also, neben der Vermittlung vorübergehender elektrischer Signale, auch die Konzentrationen intrazellulärer Botenstoffe beeinflussen und damit die Effizienz der synaptischen Übertragung langfristig ändern. Nach wie vor ist allerdings unklar, wie, angesichts der hohen Umsatzrate der Zellbestandteile, diese Änderungen Wochen, Monate, oder gar ein Leben lang andauern können.

DES BLUTBILDENDEN SYSTEMS

Blut enthält viele verschiedene Zelltypen, alle mit sehr unterschiedlichen Funktionen (z.B. Sauerstofftransport, Immunabwehr, Phagozytose, Bildung von Antikörpern, etc.). Einige dieser Zellen arbeiten ausschließlich innerhalb des Gefäßsystems, andere benutzen es nur als Transportmittel und üben ihre Funktion in Geweben aus. Alle Blutzellen haben eine **begrenzte Lebensdauer** und müssen deshalb das ganze Leben lang nachproduziert werden. Dabei bemerkenswert ist, daß sie alle letztlich von einer gemeinsamen Stammzelle im Knochenmark gebildet werden. Diese blutbildende (**hämatopoietische**) **Stammzelle** ist also totipotent, da aus ihr all die verschiedenen Sorten endgültig differenzierter Blutzellen und einige andere Zelltypen wie z.B. die Osteoklasten der Knochen entstehen können.



169: Blutausstrich und Nachweis spezifischer Zellen nach Giemsa-Färbung

Die roten Blutkörperchen oder **Erythrozyten** bleiben in den Blutgefäßen und transportieren an Hämoglobin gebundenes O_2 und CO_2. Die weißen Blutkörperchen oder **Leukozyten** bekämpfen Infektionen. Sie phagozytieren und verdauen Zelltrümmer und aufgrund ihres Erscheinungsbilds im Lichtmikroskop teilt man sie traditionell in drei Hauptkategorien ein: **Granulozyten**, **Monozyten** und **Lymphozyten**. Alle Leukozyten müssen die Wände kleiner Blutgefäße an spezifischen Stellen *(high endothelial venules*) durchdringen und zur Ausführung

ihrer Aufgaben in die Gewebe einwandern. Diesen Prozess bezeichnet man als **Emperiolyse**. Das Blut enthält zusätzlich große Mengen von **Blutplättchen**; sie sind Zellabschnürungen großer **Megakaryozyten**. Blutplättchen heften sich spezifisch an die Endothelauskleidung beschädigter Blutgefäße und helfen bei der Reparatur von Wunden und sind essentiell für die Blutgerinnung.

Alle **Granulozyten** enthalten zahlreiche Lysosomen und sekretorische Granula und werden anhand der Morphologie und der Anfärbe-Eigenschaften dieser Organellen in **drei Klassen** eingeteilt: **Neutrophile** sind der am weitesten verbreitete Granulozyten-Typ; sie phagozytieren und zerstören kleine Organismen, bevorzugt Bakterien. **Basophile** scheiden Histamin aus (bei einigen Spezies auch Serotonin) und vermitteln Entzündungsreaktionen. **Eosinophile** helfen bei der Bekämpfung von Parasiten und modulieren allergische Entzündungsprozesse. Die **Lebensdauer** von Granulozyten ist extrem kurz und liegt zwischen **8 und 24 Stunden**. Aus diesem Grund werden täglich ca. 10^{11} Granulozyten neu hergestellt.

Sobald die **Monozyten** den Blutstrom verlassen haben, reifen sie zu **Makrophagen**, die zusammen mit den Neutrophilen die wesentlichen „professionellen Phagozyten" des Körpers darstellen. Phagozytierte Mikroorganismen werden dadurch einem wahren Sperrfeuer von enzymatisch hergestelltem, hochreaktivem **Superoxid** und **Hypochlorit** und einer konzentrierten Mischung von **lysosomalen Hydrolasen** ausgesetzt. Makrophagen sind jedoch viel größer als Neutrophile und leben auch viel länger als jene. In vielen Geweben sind sie dafür verantwortlich, daß alt gewordene, tote und beschädigte Zellen entfernt werden. Als einzige sind sie in der Lage, so große Mikroorganismen wie z.B. Protozoen zu fressen.

Bei den Lymphozyten gibt es zwei Hauptklassen, die beide an Immunreaktionen beteiligt sind: **B-Lymphozyten** stellen Antikörper her, **T-Lymphozyten** töten Virus-infizierte Zellen ab und regulieren die Aktivitäten anderer weißer Blutkörperchen. Außerdem gibt es Lymphozyten-ähnliche Zellen, sogenannte natürliche Killerzellen (**NK-Zellen**), die einige Arten von Tumorzellen und Virus-infizierten Zellen töten.

Blutzellen

Zelltyp	**Hauptfunktion**	**typische Konzentration im menschlichen Blut (Zellen/Liter)**
rote Blutkörperchen (**Erythrozyten**)	Transport von O_2 und CO_2	5×10^{12}
weiße Blutkörperchen (**Leukozyten**)		
Granulozyten		
Neutrophile (polymorphkernige Leukozyten)	phagozytieren und zerstören einwandernde Bakterien	5×10^{9}
Eosinophile	zerstören größere Parasiten und modulieren allergische Entzündungsreaktionen	2×10^{8}
Basophile	setzen bei bestimmten Immunreaktionen Histamin (und bei manchen Arten Serotonin) frei	4×10^{7}
Monozyten	werden zu Makrophagen im Gewebe, phagozytieren und verdauen eingefallene Mikroorganismen und Fremdkörper, sowie beschädigte alte Zellen und Lymphozyten	4×10^{8}
B-Zellen	machen Antikörper	2×10^{9}
T-Zellen	töten Virus-infizierte Zellen und regulieren Aktivität anderer Leukozyten	1×10^{9}
natürliche Killer-(**NK-)Zellen**	töten Virus-infizierte Zellen und einige Tumorzellen	1×10^{8}
Blutplättchen (Zellbruchstücke, die im Knochenmark aus Megakaryozyten entstehen)	leiten die Blutgerinnung ein	3×10^{11}

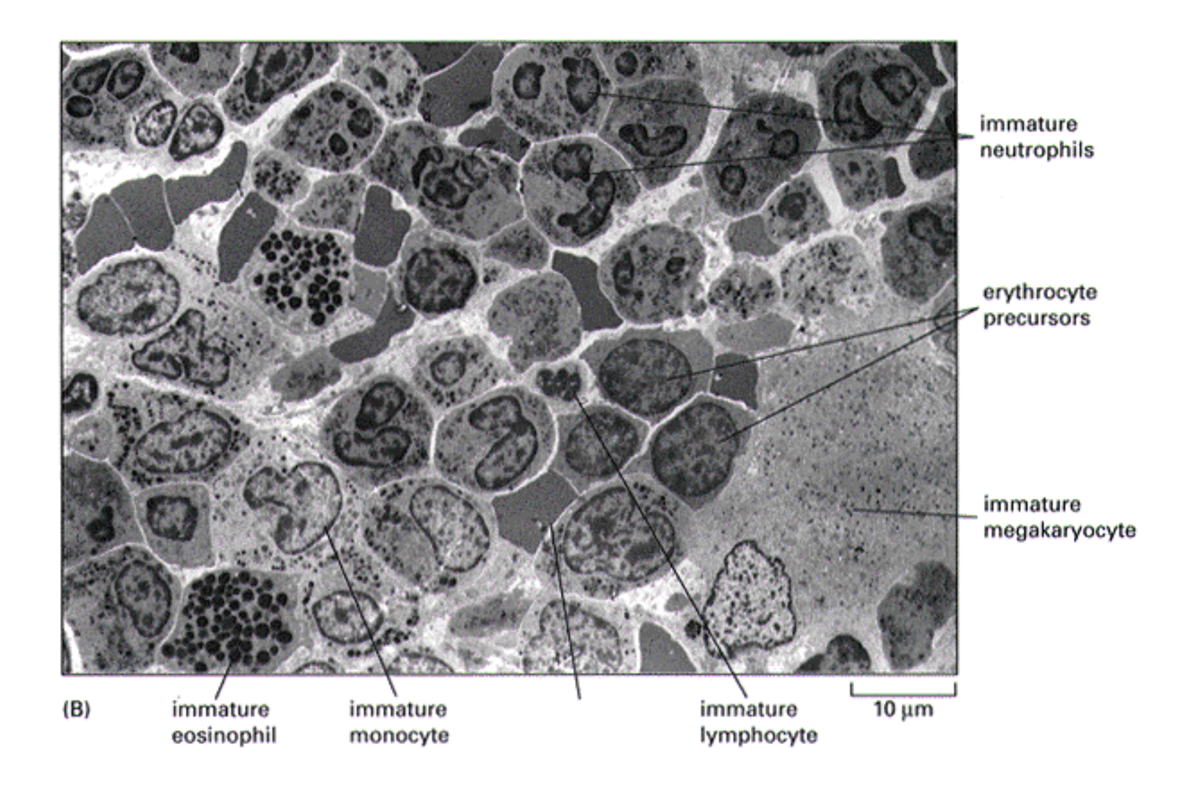
Die meisten weißen Blutkörperchen arbeiten in Geweben. Das Blut transportiert sie lediglich zu den Orten, wo sie gebraucht werden. Eine örtliche Infektion oder Verletzung in irgendeinem Gewebe lockt schnell Leukozyten in das betroffene Gebiet; das ist Teil der **Entzündungsantwort**, die bei der Infektionsbekämpfung und Wundheilung hilft. Die Entzündungsantwort ist sehr komplex; eine Vielzahl von **Signalmolekülen** ist beteiligt (meist kleine Peptide), die vor Ort von Mastzellen, Nervenendigungen, Blutplättchen und Leukozyten hergestellt werden; außerdem spielt die Aktivierung von **Komplement** eine Rolle. Durch die Signalwirkung verändert sich die Oberfläche der Endothelzellen (kleiden die Blutgefäße aus) und ermöglichen es so den Leukozyten, die Blutbahn zu verlassen. Die erste Bindung der Leukozyten an die **Endothelzellen** wird von **Selectinen** vermittelt; für eine festere Bindung, die zum Verlassen des Blutgefäßes nötig ist, sorgen **Integrine**. Andere Moleküle wirken als chemische Lockstoffe für spezifische Typen von Leukozyten (**Chemokine**). Diese Zellen werden daraufhin polarisiert und bewegen sich auf die Quelle des Lockstoffes zu. Am Ende gelangt eine große Zahl Leukozyten in das betroffene Gewebe.

Andere Signalmoleküle, die im Verlauf einer Entzündungsreaktion produziert werden, gelangen ins Blut und stimulieren im Knochenmark die vermehrte Herstellung von Leukozyten und ihre Freisetzung in den Blutstrom. Das **Knochenmark** ist der Hauptangriffspunkt einer derartigen Regulation, weil praktisch alle Typen von Blutzellen im Knochenmark gebildet werden. Die Regulation für die vermehrte Bildung neuer Zellen scheint Zelltyp-spezifisch zu sein: einige bakterielle Infektionen verursachen z.B. eine selektive Zunahme von Neutrophilen, während bei Infektionen mit Protozoen und anderen Parasiten vermehrt Eosinophile auftreten.

Unter bestimmten Umständen wird die Erythrozyten-Bildung gezielt verstärkt, z.B. wenn man längere Zeit in großer Höhe lebt, wo es weniger Sauerstoff gibt (oder kurz vor Olympiaden…). Zur Bildung von Blutzellen gehören also umfangreiche Kontrollen, durch die die Bildung eines jeden Blutzell-Typs individuell reguliert wird, damit auf sich ändernde Bedürfnisse eingegangen werden kann.

In intakten Tieren ist die Blutbildung sehr schwieriger zu analysieren, aber blutbildende Zellen haben einen nomadischen Lebensstil, so daß sie auf diese Weise für experimentelle Untersuchungen zugänglich sind. Vereinzelte hämatopoietische Zellen können leicht, ohne Beschädigung, von einem Tier auf ein anderes übertragen werden; Proliferation und Differenzierung individueller Zellen und ihrer Nachkommen lassen sich in einer Kultur beobachten und analysieren. Daher weiß man mehr über die Moleküle, die die Produktion von Blutzellen kontrollieren, als über jene, die die Zellbildung in anderen Säuger-Geweben überwachen.

Eines der wesentlichen Konzepte der Hämatopoiese ist das **Konzept der Stammzelle** (siehe Seite 10). Die Identifikation einer einzelnen Stammzelle ist äußerst kompliziert und bislang nur für diverse Tiermodelle reproduzierbar gelungen. Das Konzept der Stammzelle besagt, daß man - theorethisch - nur diese eine Zelle braucht, um das blutbildende System eines ganzen Organismus zu rekonstruieren und dieses System für lange Zeit aufrecht zu erhalten (Forderung der **Omnipotenz** und der **Selbsterneuerungsfähigkeit**).



170: Knochenmark-Schnitt (dunkle Fächen: ausgewaschenes Fettgewebe)

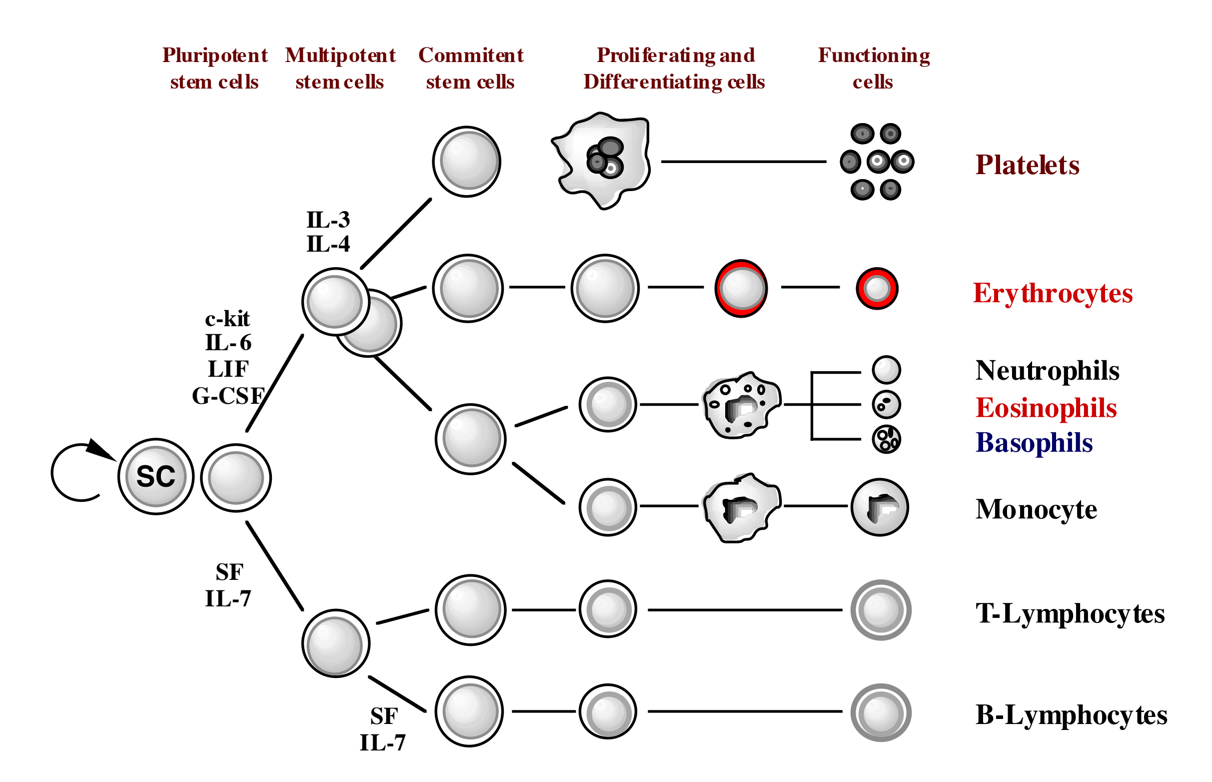
Die verschiedenen Typen von Blutzellen und ihre unmittelbaren Vorläufer können im Knochenmark an ihrem unterschiedlichen Aussehen erkannt werden. Sie sind sowohl miteinander, als auch mit **Fett-** und anderen **Stromazellen** (Zellen des Bindegewebes) vermischt, die ein feinmaschiges, tragendes **Netz aus Kollagenfasern** und anderen Bestandteilen der **extrazellulären Matrix** bilden. Außerdem wird das ganze Gewebe gut mit dünnwandigen Blutgefäßen (sogenannten **Blutsinus**) versorgt, in die die neuen Blutzellen abgegeben werden. **Megakaryozyten** sind ebenfalls vorhanden; anders als die übrigen Blutzellen, bleiben sie auch während der Reifung im Knochenmark und sind mit ihrer außergewöhnlichen Größe (bis zu 60 μm im Durchmesser) und ihrem stark polyploiden Kern eines seiner auffälligsten Merkmale. Normalerweise **liegen** sie **dicht neben den Blutsinus** und strecken Fortsätze durch Löcher in der Endothel-Auskleidung dieser Blutgefäße; von diesen Ausläufern schnüren sich Blutplättchen ab und werden mit dem Blut weggeschwemmt.

Wegen der komplizierten Anordnung der Zellen im Knochenmark ist es schwierig, andere als die direkten Vorläufer der reifen Blutzellen zu identifizieren. Die entsprechenden Zellen der früheren Entwicklungsstadien sehen einander sehr ähnlich - eine offensichtliche Differenzierung hat noch nicht begonnen. Es gibt kein sichtbares Merkmal, an dem die eigentlichen Stammzellen erkannt werden können. **Zur Identifizierung und Charakterisierung der Stammzellen benötigt man einen Funktionstest**.

Wird ein Tier einer hohen Dosis von Röntgenstrahlen ausgesetzt, werden die meisten hämatopoietischen Zellen zerstört, und das Tier stirbt innerhalb weniger Tage, weil es keine neuen Blutzellen herstellen kann. Das Tier kann jedoch durch eine **Transfusion** von Zellen gerettet werden, die dem Knochenmark eines gesunden, **immunologisch verträglichen Spender-Tiers** entnommen wurden. Unter diesen Zellen befindet sich eine kleine Anzahl (ungefähr 1 unter 100.000-1.000.000), die sich im bestrahlten Wirtstier ansiedeln können und es dauerhaft mit blutbildendem Gewebe versorgen. Eines der Gewebe, wo Kolonien entstehen, ist die Milz, die in einer gesunden Maus ebenfalls ein wichtiger Ort der Blutbildung ist. Wenn man die Milz einer bestrahlten Maus eine oder zwei Wochen nach der Transfusion von gesunden Spender-

zellen untersucht, findet man in ihr eine Anzahl von Knoten, die alle eine Kolonie myeloider Zellen enthalten. Nach zwei Wochen bestehen einige Kolonien aus mehr als einer Million Zellen. Dabei handelt es sich jeweils um einen Klon von Zellen, der von einer einzelnen Gründerzelle abstammen.

Der Gründer einer solchen Kolonie wird als **Kolonie-bildende Zelle** oder **CFU** (colony-forming unit) bezeichnet. Die Kolonie-bildenden Zellen sind heterogen. Aus einigen entsteht nur ein Typ myeloider Zellen, andere bilden Mischungen. Einige machen viele Teilungszyklen durch und bilden große Kolonien, andere teilen sich seltener und bilden kleine Kolonien. Die meisten Kolonien gehen zugrunde, nachdem sie eine begrenzte Zahl endgültig differenzierter Blutzellen geschaffen haben. Einige Kolonien sind jedoch zu einer umfangreichen Selbsterneuerung fähig und bilden neben endgültig differenzierten Blutzellen auch neue Kolonie-bildende Zellen. Man vermutet, daß die Gründer solcher sich selbst erneuernder Kolonien die blutbildenden Stammzellen im übertragenen Knochenmark sind.



171: einfaches Schema der Hämatopoiese

Wenn sich eine Zelle erst einmal zu einem Erythrozyten oder einem Granulozyten oder einem anderen Blutzelltyp differenziert hat, gibt es anscheinend kein Zurück mehr: der **Differenzierungszustand ist nicht reversibel**. Daher muß ein Teil der Nachkommen einer totipotenten Stammzelle an irgendeinem Punkt ihrer Entwicklung irreversibel auf eine bestimmte Differenzierungslinie festgelegt oder determiniert werden. Schon aus einfachen mikroskopischen Untersuchungen am Knochenmark wird klar, daß diese Bestimmung lange vor der letzten Teilung erfolgt, bei der die reife differenzierte Zelle gebildet wird: man kann spezialisierte Vorläuferzellen erkennen, die noch proliferieren, aber schon Anzeichen einer begonnenen Differenzierung zeigen. Demnach scheint der Festlegung auf eine bestimmte Differenzierungslinie eine Serie von Zellteilungen zu folgen, die die Anzahl der Zellen eines gegebenen spezialisierten Typs vervielfachen. Nach terminaler Differenzierung findet in der Regel keine Proliferation mehr statt. Daraus hat man gefolgert: **Differenzierung und Proliferation schließen sich gegenseitig aus!!**

Man kann das blutbildende System daher als eine Hierarchie von Zellen ansehen. Totipotente Stammzellen erzeugen **Vorläuferzellen**, die irreversibel als Ahnen nur eines oder weniger Typen von Blutzellen **determiniert** sind. Die festgelegten Vorläufer teilen sich schnell, aber nicht unbegrenzt häufig. Am Ende dieser Reihe von Vervielfältigungs-Teilungen entwickeln sie sich zu endgültig differenzierten Zellen, die sich gewöhnlich nicht weiter teilen und innerhalb mehrerer Tage oder Wochen sterben. Zellen können aber auch auf irgendeiner früheren Stufe dieses Weges sterben.

Blutbildende Zellen werden in einer Zellkultur nur überleben, bzw. sich vermehren und differenzieren, wenn sie mit **spezifischen Wachstumsfaktoren** (Cytokinen) versorgt oder von Zellen begleitet werden, die diese Faktoren herstellen (Co-Kultivierung mit *feeder* Zellen). Bei Mangel an solchen Faktoren werden die Zellen sterben.

Heutzutage kann eine langfristige Proliferation totipotenter Stammzellen nur dann erreicht werden, wenn man z.B. hämatopoietische Knochenmarkzellen auf einer Schicht von Stromazellen aus dem

Knochenmark kultiviert; so wird vermutlich die Umgebung im intakten Knochenmark nachgeahmt. Solche Kulturen können alle Sorten myeloider Zellen hervorbringen. Andererseits kann man blutbildende Knochenmarkzellen auf einer halbfesten Matrix aus dünnem **Agar** oder **Methylcellulose** kultivieren; aus anderen Zellen stammende Faktoren können künstlich dem Medium zugesetzt werden. Weil Zellen auf einer halbfesten Matrix nicht wandern können, bleiben die Nachkommen jeder einzelnen Vorläuferzelle als leicht erkennbare Kolonie zusammen. So kann z.B. eine isolierte festgelegte Vorläuferzelle für Neutrophile einen Klon von Tausenden von Neutrophilen hervorbringen. Derartige Zellkultursysteme wurden in der Mitte der 60er Jahre entwickelt und eröffnen einen Weg, solche Wachstumsfaktoren zu analysieren. Heute können viele dieser Faktoren rekombinant hergestellt und eingesetzt werden.

Diese Wachstumsfaktoren erwiesen sich häufig als Glykoproteine und werden gewöhnlich **CSFs** (colony-stimulating factors) genannt. Von der wachsenden Anzahl der CSFs, die bestimmt und gereinigt wurden, kreisen einige im Blut und arbeiten **systemisch** als Hormone; andere sind nur im Knochenmark aktiv - entweder als sezernierte **lokal**e Vermittler oder als Membran-gebundene Signale, die über Zell/Zell-Kontakte wirken. Der in seiner Wirkung am besten verstandene unter den als Hormon tätigen CSFs ist das Glykoprotein **Erythropoietin**, das in den **Nieren** gebildet wird und die Erythropoiese (die Bildung roter Blutkörperchen) reguliert.

Erythrozyten sind bei weitem der häufigste Zelltyp im Blut. Im reifen Zustand sind sie mit Hämoglobin vollgepackt und enthalten praktisch keine der üblichen Zellorganellen. In einem Erythrozyten eines erwachsenen Säugers **fehlen** sogar **Kern**, **ER**, **Mitochondrien** und **Ribosomen**; sie werden von der Zelle im Laufe der Erythrozyten-Entwicklung ausgestoßen. Der Erythrozyt kann nicht wachsen und sich nicht teilen; die einzige Möglichkeit, mehr Erythrozyten herzustellen, ist die Hämatopoiese. Außerdem besitzen Erythrozyten eine begrenzte Lebensspanne - ungefähr 120 Tage bei Menschen und 55 Tage bei Mäusen. Überalterte und funktionslose Erythrozyten werden von Makrophagen in Leber und Milz phagozytiert; in jedem von uns entfernen sie täglich mehr als 10^{11} alt gewordene Erythrozyten.

Sauerstoffknappheit oder ein **Mangel an Erythrozyten** regt Zellen in den **Nieren** dazu an, erhöhte Mengen von **Erythropoietin** zu synthetisieren und in den Blutstrom abzugeben. Erythropoietin stimuliert die Bildung von mehr Erythrozyten. Da man eine Veränderung der Freisetzungsgeschwindigkeit neuer Erythrozyten ins Blut schon ein bis zwei Tage nach dem Anstieg des Erythropoietinspiegels im Blut feststellen kann, muß das Hormon auf Zellen einwirken, die sehr nahe Vorläufer der reifen Erythrozyten sind.

Ein wichtiger **CSF** für Erythrozyten-Entwicklung ist **Interleukin 3**; dieses Cytokin fördert das Überleben und die Teilung der früheren Erythrozyten-Vorläuferzellen. In seiner Gegenwart entwickeln sich innerhalb von 7-10 Tagen eine große Kolonie mit bis zu 5.000 Erythrozyten aus Knochenmark-Kulturzellen. Diese Kolonien stammen von Erythrozyten-Vorläuferzellen ab, die **BFU-E** (erythrocyte burst-forming unit) genannt werden. Die BFU-E unterscheidet sich insofern von totipotenten Stammzellen, als sie nur über eine begrenzte Teilungsfähigkeit verfügt und Kolonien bildet, die lediglich Erythrozyten enthalten, auch unter Bedingungen, unter denen andere Vorläuferzellen andere Klassen differenzierter Blutzellen hervorbringen könnten. Sie unterscheidet sich von der später entstehenden **CFU-E** darin, daß sie gegenüber Erythropoietin unempfindlich ist und ihre Nachkommen noch 12 Teilungen durchmachen müssen, bevor sie reife Erythrozyten werden (dazu muß Erythropoietin anwesend sein). Aus CFU-E Zellen entwicklen sich innerhalb von wenigen Tagen rund 60 reife Erythrozyten. Die CFU-Es enthalten selbst noch kein Hämoglobin. Das Überleben und die Proliferation der CFU-Es hängen von Erythropoietin ab: entfernt man das Erythropoietin aus den Zellkulturen tritt bei den Zellen rasch der programmierte Zelltod (Apoptose) ein.

Ähnliches gilt auch für viele andere CFU-Zellen (CFU-GM, CFU-G; Vorläufer für B- und T-Zellen). Alle diese Zellen sind von spezifischen Cocktails an geeigneten Cytokinen abhängig, die ihr Überleben sichern. Die meisten **CSFs**, die man bislang identifizieren konnte, stimulieren in Kultur jedoch vorwiegend die Bildung von myeloischen Zellen. CSFs, die spezifisch die Bildung von Lymphozyten anregen, wurden bislang noch nicht identifiziert.

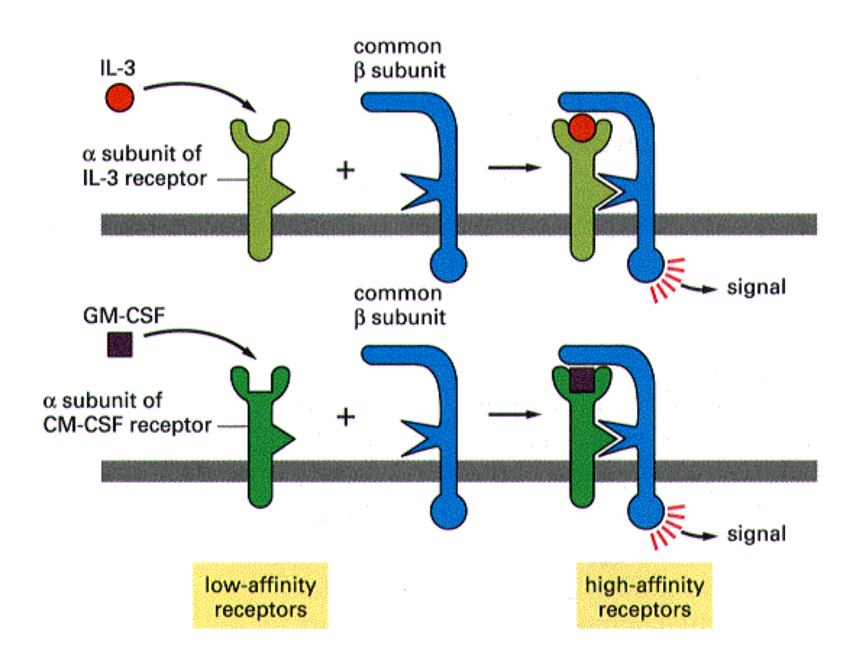
Allerdings hat man das Konzept formuliert, daß nicht nur die Anwesenheit von CSFs, sondern auch deren lokale Konzentration von entscheidender Bedeutung ist, um *in vivo* die Bildung der verschiedenen hämatopoietischen Zellen zu regulieren. In Rahmen dieses Konzepts wurde für die Entwicklung einzelner Zelltypen bereits gezeigt, daß Cytokine i.d.R. für das Überleben der Zellen wichtig sind. Das normale Verhalten der Zellen beim Fehlen von CSFs ist Selbstmord. Im Grunde könnten die CSFs die Anzahl der verschiedenen Blutzelltypen völlig durch selektive Kontrolle des Überlebens der Zellen regulieren; und es gibt immer mehr Beweise dafür, daß diese Art der Kontrolle eine Hauptrolle bei der normalen Regulierung der Anzahl der Blutzellen spielt. Allerdings scheint es für jeden Zelltyp auch noch sog. Leit-Cytokine zu geben, die differenzierende Eigenschaften aufweisen und somit die terminale Differenzierung in den Zellen auslöst.

Faktor	Größe	Zielzelle	Produzentenzellen	Rezeptoren
EPO	51	CFC-E	Nierenzellen	Cytokin-Familie
IL-3	25	plurip. StZ, VLZ, terminal diff. Zellen	T-Lymphozyten, Epidermiszellen	Cytokin-Familie
GM-CSF	23	GM-VLZ	T-Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten	Cytokin-Familie
G-CSF	25	GM-VLZ Neutrophile	Makrophagen, Fibroblasten	Cytokin-Familie
M-CSF	70 (Dimer)	GM-VLZ Makrophagen,	Fibroblasten, Makrophagen Endothelzellen	Tyrosinkinase-Rezeptor
Steel-Faktor	40-50 (Dimer)	blutbildende Stammzelle	Stromazellen im Knochenmark	Tyrosinkinase-Rezeptor

CSFs werden prinzipiell von verschiedenen Zelltypen synthetisiert - u.a. von **Endothelzellen**, **Fibroblasten**, **Makrophagen** und **Lymphozyten**; ihre Konzentration im Blut steigt in charakteristischer Weise als Antwort auf eine bakterielle Infektion eines Gewebes an, wodurch die Zahl der vom Knochenmark ans Blut abgegebenen phagozytierenden Zellen erhöht wird. Interleukin-3 ist der am wenigsten spezifische

dieser Faktoren, er wirkt sowohl auf totipotente Stammzellen, als auch in den meisten Klassen festgelegter Vorläuferzellen der myeloischen Reihe. Das gleiche gilt auch für Interleukin 7 und dessen Bedeutung für die Entwicklung von lymphozytären Vorläuferzellen (siehe Abb. 171).

Alle diese **CSFs sind Glykoproteine**, die bei niedrigen Konzentrationen von ca. 10^{-12} M durch Bindung an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche wirken (siehe Kapitel Kommunikation). Einige dieser Rezeptoren sind **Transmembran-Tyrosinkinasen**. Die übrigen gehören zu einer anderen großen Rezeptorfamilie (manchmal als Cytokinrezeptor-Familie bezeichnet); deren Mitglieder sind gewöhnlich aus zwei oder mehr Untereinheiten aufgebaut, eine von diesen ist häufig mehreren Rezeptortypen gemeinsam. Die CSFs arbeiten nicht nur mit Vorläuferzellen, um die Produktion differenzierter Nachkommen zu fördern, sondern sie aktivieren auch die spezialisierten Funktionen der endgültig differenzierten Zellen (z.B. Phagozytose oder Zielzell-Abtötung). Die künstlichen Proteinprodukte der klonierten Gene dieser Faktoren (sie werden manchmal als **rekombinante Faktoren** bezeichnet, weil sie durch den Einsatz rekombinanter DNA-Technologie hergestellt wurden) sind starke Stimulatoren der Blutbildung in Versuchstieren und in klinischen Experimenten am Menschen.



172: ß-UE dienen spezifischen Cytokin-Rezeptoren als gemeinsamer Signalgeber

Die CSFs, die auf totipotente Stammzellen wirken, sind äußerst faszinierend. Ein derartiger Faktor mit grundlegender Bedeutung wurde erkannt, als man mutierte Mäuse mit einer eigenartigen Kombination von Defekten analysierte: Mangel an roten Blutkörperchen (Anämie), Keimzellen (Sterilität) und Pigmentzellen (weiße Flecken auf der Haut). Dieses Syndrom ist die Folge von Mutationen in einem von zwei Genen. Eines wird **c-kit** genannt und kodiert eine Rezeptor-Tyrosinkinase; das andere, **Steel** genannt, kodiert deren Liganden. Sämtliche von diesen Mutationen betroffenen Zelltypen stammen von wandernden Vorläufern ab; es scheint, daß die Vorläufer in jedem Fall den Rezeptor exprimieren (Kit) und von der Umgebung mit dem Liganden (Steel) beliefert werden müssen, wenn Nachkommenzellen in normalen Mengen produziert werden sollen.

Der Steel-Faktor wirkt auf mehrere festgelegte Blutzell-Linien, einschließlich der Erythrozytenlinie und auch auf die totipotenten Stammzellen; er hat aber nur geringe Eigenaktivität, sondern potenziert hauptsächlich die Wirkungen anderer CSFs, was zu einer deutlichen Zunahme der Zahl und Größe aller Arten klonaler Blutzell-Kolonien in Kultur führt. Der Steel-Faktor ist auch sonst ein ungewöhnlicher CSF. Durch alternatives Spleißen seiner mRNA wird er in einer Membran-gebundenen und in einer sezernierten Form hergestellt; dabei scheint die Membran-gebundene die wichtigere Form zu sein: mutierte Mäuse, die die sezernierte Form des Steel-Faktors bilden, aber nicht die Membran-gebundene, zeigen schwere Defekte. Dies deutet darauf hin, daß normale Blutbildung **direkte Zell/Zell-Kontakte** zwischen der **blutbildenden Stammzelle** und einer **Stromazelle**, die Steel exprimiert, erfordert, und daß nur aufgrund dieser Kontakte der Steel-Faktor das Kit-Rezeptorprotein wirksam aktivieren kann.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei denjenigen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Biologie bedanken, die mir durch ihre Unterstützung die Abfassung dieses Skripts ermöglicht haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Unha Monika Baik für ihre liebenswerte Unterstützung bei der Korrektur dieses Skriptes bedanken.